Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der
Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H. Schuermann

Über die Kultivierung des Treponema pallidum

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Gisela Freiin von Schleinitz

aus Braunschweig

Würzburg 1955

Referent: Professor Dr. med. Hans Schuermann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündl. Prüfung:

13. März 1955

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0114

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 7

A. Frühere Versuche der kulturellen Reinzüchtung 7

B. Neue Erkenntnisse über die Möglichkeit der kulturellen Züchtung des Treponema pallidum und seiner Kulturstämme . . . 13

I. Züchtungsversuche in künstlichen Nährmedien 13

a) Züchtung der Reiter-Spirochäten 13

b) Versuche einer Kultivierung des virulenten Treponema pallidum 20

c) Vergleich der Wachstumsfaktoren des Treponema pallidum und seiner Kulturstämme 23

II. Kultivierungsversuche auf tierischen Nährböden 25

a) Der virulente Nichols-Stamm 25

b) Der avirulente Nichols- und Kazan-Stamm 26

c) Der Reiter-Stamm 27

III. Züchtung auf Gewebenährböden 27

C. Eigene Versuche, ein Überleben der Treponemata pallida (Nichols-Stamm) in einem Placentanährboden zu erreichen . . 28

I. Bisherige allgemeine anaerobe Züchtungsverfahren 28

II. Eigene Methodik 30

a) Nährmedium 30

b) Puffergemisch 30

c) Impfmaterial 30

d) Verimpfung und Inkubation 30

e) Kontrollen 31

f) Bestimmung der Überlebensquote 31

III. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen 31

Zusammenfassung 33

Seit der Entdeckung des Treponema pallidum (Tr. p.) am 3. März 1905 durch Schaudinn und Hoffmann steht in der experimentellen Syphilisforschung das Suchen um Erkenntnisse über Pathologie, Immunologie, Morphologie, Stoffwechsel, chemischen Aufbau und mutmaßlichen Lebenscyclus des Erregers der Krankheit im Vordergrund.

Obwohl die Gleichsetzung von „in vitro"- mit „in vivo"-Resultaten oft hypothetisch und eine Schlußfolgerung aus Tierexperimenten nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar ist, bleibt in den meisten Fällen nur das Experiment als einziger Weg zur Klärung noch offener Fragen über die Biologie der Syphilis.

Die Kultivierung des Tr. p. auf künstlichen Nährböden in virulenter Form ist ein noch ungelöstes Problem. Es gelang lediglich Nelson ein Nährmedium herzustellen, in dem die Tr. p. wenigstens für einige Tage ihre Beweglichkeit beibehalten und auch ein Längenwachstum — aber keine Vermehrung — aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen über die Züchtung von Kulturspirochäten und der Kultivierungsversuche des Tr. p. besprochen werden.

Die Wege, die zur Lösung des Problems der Kultivierung eingeschlagen wurden, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Kultivierung von Kulturstämmen des Tr. p., Studium ihrer Stoffwechselbedingungen und Wachstumsfaktoren und des Effektes eines Wechsels der chemischen und physikalischen Konstitution des Nährmediums auf Morphologie und Lebensdauer.
2. Studium der morphologischen und nutritiven Unterschiede zwischen virulenten Tr. p. und den avirulenten Kulturspirochäten.
3. Isolierung von Wachstumsfaktoren für das virulente Tr. p. und Versuche, mittels dieser ein optimales Medium für Überleben und Fortpflanzung zu finden.
4. Nutzbarmachung von Gewebenährböden und tierischen Nährmedien für die Züchtung des Treponema pallidum und seiner avirulenten Kulturstämme.

A. Frühere Versuche der kulturellen Reinzüchtung.

Ohne Zweifel erschienen die meisten Berichte über eine angeblich gelungene Züchtung des virulenten Tr. p. in Reinkultur in den ersten zwei Jahrzehnten nach seiner Entdeckung. Wenn es auch den Autoren nicht gelang, ihre Ergebnisse in wiederholten Untersuchungsreihen zu bestätigen oder aber mit den von ihnen angegebenen Züchtungsmethoden der Kritik anderer standzuhalten, war es doch späteren Untersuchern möglich, auf diesen Erfahrungen weitere Züchtungsversuche aufzubauen.

Es erscheint daher gerechtfertigt, in knapper Form die wichtigsten Untersuchungen dieser Jahre zu erwähnen, wobei im Rahmen dieser Arbeit vor allem auf die Zusammensetzung des Nährbodens — besonders unter anaeroben Bedingungen — und die Methode der angeblichen Reinzüchtung eingegangen werden soll.

Tabelle 1

Über die Züchtung von angeblichen Reinkulturen des Tr. p. berichteten:

Untersucher	Nährboden	Art der anaerob. Züchtung	Methode d. Reinigung d. Mischkultur
Schereschewsky (1909/14)	Steriles Pferdeserum im Beginn der Koagulation	Korkverschluß	a) Durchschneiden d. Röhrchens u. Nährbodens unterhalb der sichtbaren Verunreinigung; b) Töten d. Begleitbakterien durch 70%igen Alkohol
Mühlens (1909)	Nach Schereschewsky	„Zusatz III" = Begleitbakterien: Dicke, plumpe Stäbchen, mit Geißeln, Sporenentwicklung, keine ¡Gramfärbung	Schüttelkultur; Weiterzüchtung in Serumagar 1:2
W. H. Hoffmann (1911)	Nach Schereschewsky; Serumagar nach Mühlens	Zusatz III	a) Schüttelkultur; b) Isolierungsverfahren, d. h. Überimpfen der vom Einstichkanal entfernt wachsenden Tr. p.
Sowade (1911)	Nach Schereschewsky	Verschluß mit Watte und Gummikappe	Abgießen des sich oberflächlich verflüssigenden Nährbodens und Abspülen mit 70%igen Alkohol
Shmamine (1911/12)	Pferdeserum mit Zusatz v. ameisen- od. nukleinsaurem Natrium	Durchleiten von CO_2	Isolierung durch Schüttelröhrchen, Auswaschen mit Na Cl-Lösung, Züchtung auf Serumzuckeragar mit Na-nucleinicum
Noguchi (1911/12)	Tier. Material: Serumwasser 1:3 u. frisches steriles Gewebe; Blutserum; Menschl. Material: Ascitesagar 1:2 u. frisches steril. Gewebe	Paraffinverschluß; Einleiten von H_2; Anaeroben-Apparat mit Pyrogallolsäure; Gewebestücke	a) Überimpfung in Serumagar; b) Hindurchwachsen durch Berkefeldfilter
Tomasczewski (1912)	Nach Schereschewsky		Überimpfung der in der Tiefe wachsenden nicht verunreinigten Tr. p. auf Serumagar in hoher Schicht
Nakano (1912)	Pferdeserum; Serumagar 1:2; Serumascites 3:1; Serumpeptonagar (2%ig. Pferdeserumpepton und Agar 3:1)		Hindurchwachsen durch Reichel-Bakterienfilter
Arnheim (1909/14)	Serumagar und frisches Gewebe	Kaninchenhirn oder -hoden; Kultur eines isolierten grampositiven Stäbchens	Überimpfung von Tr. p.-haltigem Nährboden in neue Röhrchen über viele Passagen
Szeczi (1913)	Nach Schereschewsky		Nach Sowade
Baeslack (1913)	Nach Schereschewsky	Wasserstoff-Atmosphäre	
Bronfenbrenner (1914)		Überimpfung in salvarsanhaltigen Nährboden	

Untersucher	Nährboden	Art der anaerob. Züchtung	Methode d. Reinigung der Mischkultur
Zinsser und Mitarbeiter (1915/16)	Nach Schereschewsky; Ascitesagar und steriles Gewebe	Sterile Gewebestücke	Hindurchwachsen durch Berkefeldfilter
Wile und de Kruif (1916)	Ascitesagar und steriles Gewebe	Kaninchenniere Paraffinverschluß; Anaerobe Bebrütung	Weitere Überimpfung
Worms (1920)	Nach Schereschewsky		Abflammen des oberen verunreinigten Nährbodenanteils
v. Wassermann und Ficker (1922)	Flüssige u. halbfeste Nährböden		
Kissmeyer (1923)	Ascitesagar und Kaninchenniere	Nach Noguchi	Nach Noguchi
Krantz (1923)	Nach Schereschewsky; Koaguliertes Serum u. 1% Methylenblau Menschl. Serum u.	Vaseline-Verschluß Salvarsanzusatz	Abtrennen des unteren Nährbodenanteils, Subkulturen in Bouillon mit Eier- oder Serumeiweiß
Grütz (1924)	Menschliches Serum	Anaerob	
Aristowsky u. Hoeltzer (1925)	Nach Schereschewsky	Tr. p.-haltigen Nährboden in menschl. Serum mit 0,9%iger NaCl-Lösung 1:2, 1 Std. inaktiviert, Zusatz von Kaninchenhirn oder -hoden	
Kroó und Schulze (1928)	Halbstarres Pferdeserum mit Meerschweinchenleber	Kaninchenserum mit Normosol 1:1, Meerschweinchenleber, durch Seitz-Filter filtriert, Paraffinverschluß	Weitere Überimpfung; Reine Subkulturen in:
Organesjan (1932)	Flüssiger Nährboden nach Aristowsky	Überimpfung auf	Fortner-Platten
Kast und Kolmer (1933)	Hormonbrühe, Ascites, 0,1% neutrales salzsaures Cystein und 1 Tropfen einer Kultur eines dünnen gramnegativen Stäbchens, Vaselineverschluß		Begleitbakterien sterben nach 2—3 Wochen ab, damit ist die Kultur gereinigt. Subkulturen in Ascites-Cystein-Bouillon
E. Hoffmann und Frohn (1934)	Nach Kroó: Sterile Kaninchenleberstücke in 5%iger Kaninchenserum-Bouillon, Paraffinverschluß		
Griegorieff (1936/39)	Direkte Reinzüchtung aus Luiker-Blut auf Tarozzi-Nährböden		

Als Ausgangsmaterial fanden sowohl Treponemen menschlicher als wie auch experimentell erzeugter tierischer Syphilis Verwendung. Tierisches Material wurde bevorzugt, da die Notwendigkeit der Verwendung eines möglichst von Bakterien und saprophytischen Spirochäten freien Gewebes immer wieder hervorgehoben wurde (Noguchi, Grütz, Gammel und Ecker).

Schereschewsky, W. H. Hoffmann, Sowade, Shmamine, Noguchi, Nakano, v. Wassermann und Ficker, E. Hoffmann und Frohn, Grigorieff berichteten über die gelungene Überimpfung ihrer auf künstlichem Nährboden gezüchteten Treponemen auf Kaninchen und Affen (Noguchi) und über die bei den Tieren beobachteten syphilitischen Veränderungen. Sie glaubten damit den Beweis erbracht zu haben (Erfüllung der Kochschen Postulate), daß es sich bei ihren Kulturen auch tatsächlich um Reinkulturen von virulenten Tr. p. gehandelt habe.

Jahnel unterzog schon 1934 diese Experimente einer scharfen Kritik. Er wies darauf hin, daß die Übertragung der Kulturpallida ein nicht reproduzierbares Phänomen sei und sprach die Vermutung aus, daß es sich bei den meisten der angeblichen Reinkulturen um saprophytische Spirochäten aus der Genitalregion des Menschen handele, eine Ansicht, der sich zahlreiche Autoren anschlossen. Nach F. Koch bestand die einzige Möglichkeit, die saprophytischen Spirochäten von den Kulturspirochäten zu unterscheiden,

a) in der Palligenreaktion nach Gaehtgens und

b) in der Luetinreaktion mit Kulturluetin nach Noguchi,

da die aus Kulturen von saprophytischen Spirochäten anstelle von Kulturspirochäten (wie z. B. Stamm Reiter) hergestellten Extrakte nach Gaehtgens oder Noguchi sich nicht für die Pallida- oder Luetinreaktion verwenden ließen.

Als eine Ausnahme wurde zumindest in der angloamerikanischen Literatur ein Züchtungsergebnis von Kast und Kolmer betrachtet. Diese kultivierten den Nichols-Hough-Stamm und berichteten über eine einwandfreie Vermehrung der Treponemen. Intratestale Verimpfungen von verschieden alten Kulturen führten jedoch in keinem Fall zu einer Orchitis oder anderen syphilitischen Veränderungen. Dagegen konnten in einer der Lymphknoten eines Tieres, das mit einem vier Tage alten Kulturstamm geimpft worden war, lebende Treponemen nachgewiesen werden. Diese erzeugten nach etwa vier Wochen eine syphilitische Orchitis mit zahlreichen, aktiv beweglichen Tr. p. Es gelang jedoch weder Kast und Kolmer, noch ihren Nachuntersuchern, die Kultivierung mit einer erfolgreichen Übertragung auf das Tier zu wiederholen.

Alle Untersuchungen ergaben, daß mit zunehmendem Verschwinden der verunreinigenden Begleitbakterien, d. h. mit Zunahme des Reinheitsgrades der Kultur, das Wachstum der Tr. p. aufhört, diese sich morphologisch verändern und ihre Virulenz verlieren. Die Fragen nach den vermutlichen Stoffwechselprodukten der Begleitbakterien, die obligat

für Leben und Wachstum der Tr. p. zu sein scheinen oder aber deren Mittlerrolle, wie die mögliche Aufspaltung des Nährbodens und die hierdurch erst erfolgende Nutzbarmachung für die Treponemen, sind immer noch nicht geklärt. Tatsächlich gelingt eine Kultivierung des virulenten Treponema pallidum nur in Form einer Mischkultur.

In den gleichen Jahren, in denen über eine erfolgreiche Züchtung berichtet wurde, fehlte es nicht an Veröffentlichungen über negative Ergebnisse. Da nur sehr wenig über die eigentlichen Lebensvorgänge des Tr. p. bekannt war, wurde versucht, durch ein systematisches Erproben von verschiedenen Nährbodeningredienzen, durch Veränderung des pH-Wertes oder durch Bebrütung bei unterschiedlichen Temperaturen eine optimale Züchtungsmethode zu finden.

Nachdem besonders Noguchi die Bedeutung der strikten anaeroben Züchtung immer wieder betonte, versuchten viele die Anwendung von CO_2, H_2, N_2, Pyrogallolsäure usw. als Inkubationsatmosphäre durch Zusatz von reduzierenden Substanzen zum Nährmedium zu ersetzen, wie Manteufel durch 0,5 %ige Natriumsulfidlösung, Krantz durch ameisensaures Natrium, Harnstofflösung, Salvarsan oder durch Zusatz von Blut, Aristovski und Minkin durch Natriumhydrosulfitlösung und Höltzer durch Einbringen von entfetteter Watte als Sauerstoffadsorbenten anstelle von Organstückchen. In jüngster Zeit bewährten sich Natriumthioglykollat (Brewer, Whiteley und Frazier, Gelperin, Nelson) sowie Ascorbinsäure (Steinman und Eagle) als Reduktionsmittel.

Die Methoden der Reinigung der Mischkulturen sind in der Tabelle 1 angeführt, Vásárhelyi versuchte es auf anderem Wege und gab den Mischkulturen einen Zusatz von bakteriophagenhaltigem Schmutzwasser.

Über die optimale Wasserstoffionenkonzentration gingen die Ansichten zunächst auseinander, doch hat sich durch die Untersuchungen der letzten Jahre ein pH-Wert um 7,0 als günstig erwiesen. Weiss und Wilkes-Weiss wiesen auf die Veränderung des pH-Wertes durch unerwärmtes Serum (Fermentwirkung) im Gegensatz zu koaguliertem Serum hin, doch erfolgte diese Veränderung sicher auch durch andere Nährbodenzusätze oder allein durch den Stoffwechsel der Tr. p. Diese Beobachtungen führten zu Versuchen mit Zusätzen, die eine Konstanterhaltung des pH-Wertes erzielen sollten. Krantz erreichte einen konstanten pH-Wert durch Zusatz von Serum- oder Eiereiweiß, anderen gelang dieses durch Phosphatpuffer (Rose und Morton, Gelperin, Eagle und Steinman).

Interessant war das Verhalten der Tr. p. gegenüber Bakterienfiltern. Durch Berkefeldfilter wurden die Tr. p. zunächst zurückgehalten, jedoch gelang es ihnen — wie anderen beweglichen Mikroorganismen — sie nach gewisser Zeit zu durchdringen. Ebenfalls passierten sie Kolloidmembranen von einem Porendurchmesser von 0,4 µ, was bei der Größe der Tr. p. verwunderlich schien, zumal die meisten Bakterien Filter der doppelten Porengröße nicht durchdringen konnten. Da Virus-

arten noch Membranen von 0.2 μ Porendurchmesser und kleiner passierten, schienen die Tr. p. eine Mittelstelung zwischen Bakterium und Virus einzunehmen (Tilden).

Untersuchungen über die Kälteempfindlichkeit (Rosahn) ergaben, daß sich syphilitisches Gewebe, bei —1° bis —5° C im Eisschrank aufbewahrt, mindestens für vier Tage kontagiös erhielt. Nach Turner und Brayton hatten Tr. p., die über ein Jahr bei —78° C gefroren waren, nach dem Auftauen weder das typische Aussehen, noch ihre Beweglichkeit, noch ihre Virulenz verloren. In den letzten Jahren wurde die Ansicht vertreten, daß niedere Temperaturen auf die Tr. p. eher konservierend als schädigend wirken (Binder). Dagegen stand andererseits die außerordentliche Hitzeempfindlichkeit, die die Tr. p. schon bei 39° C unbeweglich werden lassen (Boak, Carpenter und Warren).

Zur Klärung der Biologie der Tr. p. wurden ferner den Nährmedien verschiedene chemische Substanzen zugegeben und die Reaktion der Tr. p. auf diese Stoffe, bzw. deren Veränderung durch die Treponemen untersucht.

Supniewski und Hano stellten fest, daß die Tr. p. kleine Mengen von verschiedenen Zuckerarten ausnutzen, wie Bioxyaceton und von den Pentosen Xylose und Arabinose. Das Tr. p. assimilierte Glycerin, nicht aber Mannit, Sorbit, Erytrit. Von den Hexosen assimilierte es Galaktose, schwieriger Fruktose, Glykose oder Mannose, jedoch keine Polysaccharide. Milchsäure und ß-Oxybuttersäure wurden zersetzt, ebenso Hexophosphorsäure und Glycerophosphorsäure unter Bildung von mineralischen Phosphaten. Das Tr. p. besaß ausgesprochene proteolytische Eigenschaften und im Nährboden stieg der Gehalt von Aminosäuren, Reststickstoff und Ammoniak. Die Untersucher kamen daher zu dem Schluß, daß der Stoffwechsel des Tr. p. dem der Tierzellen ähneln müsse.

Vásárhelyi berichtete, daß das Tr. p. als Wasserstoffdonator folgende Stoffe aktiviere: Na-propionicum, Na-lacticum, Na-succinicum, Na-malicum I, Glycerin, Dextrose, Maltose, Saccharose, Na-asparaginicum, glutaminsaures Na, Phenilalanin, Tryptophan, Tyrosin. Als Wasserstoffakzeptor konnte es Na-nitrat und Na-asparaginicum aktivieren. Von all diesen Stoffen hatten aber lediglich Glycerin einen hemmenden und Dextrose einen beschleunigenden Einfluß auf das Wachstum.

Hoshina untersuchte die Wirkung von aliphatischen Alkoholen, wobei die höheren Alkoholkonzentrationen die Tr. p. sofort unbeweglich machten, schwächere Konzentrationen sie jedoch mehrere Stunden beweglich erhielten. Niedere Alkohole hemmten weniger die Beweglichkeit als höhere und bei schwächeren Konzentrationen zeigte sich sogar bei Verwendung von Methyl- und Propylalkohol eine Bewegungsbeschleunigung, die bei Methylalkohol am stärksten, bei Äthylalkohol geringer und bei Propylalkohol am schwächsten war. Keine Reizwirkung hatten Butyl- und Amylalkohol. Bei der Untersuchung der Wirkung von Pyridin und seiner Alkylderivate auf die Beweglichkeit kam er zu

dem Schluß, daß schwache Konzentrationen der niederen Alkylderivate eine Bewegungsbeschleunigung hervorrufen, in höherer Konzentration jedoch die Beweglichkeit aufgehoben werde; je niedriger die Verbindung sei, desto höher müsse die Konzentration sein, um diesen Effekt zu erzielen.

Koch untersuchte das Verhalten der Kulturspirochäten gegenüber dem diastatischen Ferment, welches nach Marchionini durch das Tr. p. zerstört wird und stellte fest, daß den Kulturspirochäten diese Eigenschaft fehlte.

Von der Voraussetzung ausgehend, daß ein Teil der Untersucher nach ihren eigenen Angaben das Verhalten der umstrittenen „Rein"-Kulturen untersuchten, es sich nach heutigen Erkenntnissen jedoch kaum um solche gehandelt haben dürfte, sind diese Ergebnisse selbstverständlich mit Vorsicht zu verwerten. Vergleiche mit späteren Resultaten lassen vermuten, daß es sich bei den früheren Untersuchungen auch um Kulturspirochäten gehandelt hat, wenn auch nähere Angaben über die Art der verwendeten Stämme in den Arbeiten nicht enthalten sind.

B. Neue Erkenntnisse über die Möglichkeit der kulturellen Züchtung des Treponema pallidum und seiner Kulturstämme

I. Züchtungsversuche in künstlichen Nährmedien

a) Züchtung der Reiter-Spirochäten

Auf künstlichem Nährboden gezüchtete angebliche Treponemata pallida sind durch den Verlust ihrer Virulenz als ein künstliches Produkt anzusehen. Die Identität dieser Stämme mit dem Tr. p. ist oft angezweifelt worden, und die Frage, ob es sich bei dem Reiter-Stamm um Tr. p. handelt, ist auch heute noch strittig. Jene unterscheiden sich von den Tr. p. nicht allein durch die Möglichkeit der Reinzüchtung und durch den Verlust ihrer Virulenz, sondern weisen auch morphologische Unterschiede auf. Die Teilungszeit der Kulturspirochäten mit etwa 8.8 Std. (Gelpetin) steht im Gegensatz zu der von 30—32 Std. (Magnuson) für die Tr. p. Weitere Differenzen ergeben sich in Bezug auf Stoffwechselfunktionen, wie auch in Bezug auf immunologische Charakteristika. Die Verschiedenheiten des Stoffwechsels an den Beispielen der Wachstumsfaktoren sind in Tabelle 2 angeführt. Es zeigt sich, daß die bei der Kultivierung der Reiter-Spirochäten gefundenen Ergebnisse und die hieraus zu ziehenden Schlußfolgerungen, wenn überhaupt, nur mit Vorsicht auf die Tr. p. anwendbar sind.

Das Verdienst von Reiter, dem wir diesen Kulturstamm verdanken, bleibt deshalb ungeschmälert. Die von ihm angegebene Methode der Reinzüchtung in Leber-Leberbouillon wird heute noch in vielen Laboratorien geübt und hat sich als ein sicheres Mittel erwiesen, die Stämme über ungezählte Generationen am Leben zu erhalten. Die Be-

deutung der möglich gewordenen Züchtung dieser Kulturspirochäten ist trotz der obigen Ausführungen darin begründet, daß durch vorsichtige Rückschlüsse von dem Verhalten der Kulturspirochäten und deren nutritiven Erfordernissen auf bestimmte Eigenschaften des Tr. p. geschlossen und auf diesem Umweg vielleicht die Kultivierung ermöglicht werden kann.

Nicht unerwähnt soll die Herstellung des „Palligens" aus den Reiter-Spirochäten bleiben, das als empfindlicher (Gaehtgens, Führer), jedoch nicht als spezifischer (Frieboes und Zündel) Extrakt für die Pallidareaktion Verwendung findet.

Erst nahezu zwei Jahrzehnte nach Entdeckung des Tr. p. setzte eine systematische Suche nach den Wachstumsfaktoren der Reiter-Spirochäten ein, und damit begann das intensive Studium des Stoffwechsels der avirulenten Treponemen. Zweck der Untersuchungen war auch hier, Parallelen des Stoffwechsels zwischen Kulturspirochäten und den Tr. p. zu finden.

Little und Subbarow hatten 1945 festgestellt, daß die Reiter-Spirochäten zum Wachstum eine Anzahl von Vitaminen benötigen (Ascorbinsäure, Cholin, Niacin, Pantothensäure, Pyridoxin, Riboflavin, Thiamin), daß sie sich Kohlenhydrate nutzbar machen und daß das Serumalbumin in Blut, Plasma, Serum und Ascites einen guten Wachstumsfaktor darstellt.

Whiteley und Frazier verwendeten 1947 als Maßstab für die Beurteilung des Nährsubstrates die Zahl der mit jedem Medium möglichen Subkulturen und die Bestimmung der Trübung des Mediums durch photoelektrische Colorimetrie. Die erforderliche Anaerobiose erhielten sie durch Zusatz von Na-Thioglykollat zum Medium bei gleichzeitiger Aufbewahrung unter Stickstoff. Das benutzte Nährmedium wurde in seiner Zusammensetzung wie folgt angegeben:

10,0 mg/ccm	Serumalbumin
0,5 %	Glukose
0,5 %	Dinatriumphosphat
0,1 %	Na-Thioglykollat
7,0 %	Vitaminlösung: Ascorbinsäure, Niacin, Cholinchlorid, Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Pantothencalcium
1,0 %	Aminosäurengemisch: Arginin, Histidin, Lysin, Valin, Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Cystin, Threonin, Methionin, Leucin, Glycin, Alanin, Serin, Prolin, Glutaminsäure, Asparginsäure

Der eingestellte pH-Wert betrug 7,0—7,2, wobei sie nach 3—5 Tagen — zur Zeit des stärksten Wachstums — ein Absinken zum Sauren feststellten. Beim Testen der Aminosäuren fanden sie, daß kein Wachstum erfolgte bei Mangel an: Treonin, Cystin, Tryptophan, Leucin, Lysin, Histidin, Methionin, Tyrosin, Arginin, Serin; jedoch erzielten sie beim Fehlen von Phenylalanin, Glycin, Valin und Asparaginsäure 4 Subkulturen, beim Fehlen von Prolin 6 Subkulturen, von Glutaminsäure 7 Subkulturen und beim Fehlen von Alanin sogar 8 Subkulturen. Das Wachstum war um 30—40 % geringer, wenn statt Glukose Laktose, Galaktose, Glycerol, Pyruvat oder Succinat dem Nährmedium zugesetzt wurde. Da sich die Rolle des zum Wachstum nötigen Serumalbu-

mins nicht allein durch dessen Gehalt an Aminosäuren erklären ließ — in einem Nährmedium nur mit Serumalbumin ohne Zusatz von Aminosäuren erfolgte kein Wachstum — vermuteten Whiteley und Frazier, daß die Hauptfunktion in einer Schutzeigenschaft bestand (z. B. Unschädlichmachung von toxischen Fettsäuren usw., die an Glaswaren haften, sich aus Watteverschlüssen destillieren oder auch in bakteriologischen Reagenzien enthalten sind).

Gelperin, der erstmals eine genaue Beschreibung der Morphologie der Reiter-Spirochäte im Vergleich zum virulenten Tr. p. und zweier Phasen eines vermuteten Lebenscyclus gab, gelang es auch nicht, die unbekannte Komponente des Serumalbumins zu ermitteln. Alle Versuche, Reiter-Spirochäten in einem Nährmedium ohne Serumzusatz fortzupflanzen, mißlangen. Mit dem Ziel, eine große Anzahl von Treponemen zu erhalten, entwickelte Gelperin eine Züchtungsmethode, mittels der die Massenkultivierung gelang. Hierzu verwendete er ein Nährmedium bestehend aus:

0,15 % Trypticase (enzymatisches Kasein-Hydrolysat)
0,70 % Dinatriumphosphat
0,50 % Dextrose
0,50 % Hefeextrakt
0,15 % Na-Thioglykollat
10,00 % menschl. seronegatives Serum
in Aqua bidest. gelöst

Die Anaerobiose wurde durch Reduktionsmittel erreicht, so daß nur ein guter Verschluß der Röhrchen notwendig war. Das Absinken des pH-Wertes, welches auch hier während des Wachstums beobachtet wurde, konnte durch Phosphatpuffer auf ein Minimum reduziert werden. Das stärkste Wachstum wurde ebenfalls nach 3—5 Tagen beobachtet.

Rose und Morton züchteten 1951 drei Kulturstämme des Tr. p. (Nichols, Reiter, Kazan) in einem Medium folgender Zusammensetzung:

„Bacto-Heart infusion broth" (aus Rinderherz, Tryptose, NaCl)
angereichert mit:
10,0 % Serum oder Ascites
0,2 % Na-Thioglykollat
0,4 % Cystein
0,5—4,0 % Glukose

Zur Erhaltung der Anaerobiose genügte ein fester Verschluß der Röhrchen. Auf ihrer Suche nach weiteren Wachstumsfaktoren überprüften sie folgende Grundsubstanzen:

1. Plasma: Die Untersucher testeten Serum, Plasma und defibriniertes Blut. Plasma erreichte die höchste Wuchsquote.
   a) Bei 60° C erhitztes Plasma war besser als unerhitztes, durch Filtration sterilisiertes Plasma. Wegen der Überlegenheit des inaktivierten Plasmas dachten die Untersucher daran, daß dieses vielleicht den Ingredienzen des im Plasma enthaltenen Antikoagulants zuzuschreiben war. Na-Citrat erhöhte das Wachstum in Anwesenheit von Ascites nicht.
   b) Plasma allein, vor Zugabe zum Medium auf 100° C erhitzt ergab kein Wachstum, jedoch kam es zu einem solchen, wenn es zu-

sammen mit dem Nährmedium auf 100° C erhitzt wurde. Die im Plasma enthaltenen Wachstumsfaktoren waren also hitzebeständig, wurden aber von dem Koagulat des unverdünnten Plasmas adsorbiert.

c) Die optimale Plasmakonzentration lag bei 10 %. Wurde sie erhöht, sank das Wachstum rapide ab. Die durch Versuche erwiesenen Hemmungsfaktoren waren sowohl die Toxicität des Plasmas, als auch die Verdünnung des Basalmediums durch das Plasma.

2. Schwefelhaltige Komponenten: Als gut für ein Wachstum erwiesen sich Cystein und Na-Thioglykollat, jedoch wurde auch Wachstum beim Fehlen beider Substanzen festgestellt. Wahrscheinlich waren beide oder auch verwandte Substanzen im Plasma enthalten.

3. Glukose: Es konnten keine Unterschiede des Wachstums bei einem Glukosegehalt von 0,5—4,0 % festgestellt werden. Die Schädlichkeit höherer Konzentrationen wurde, wie der der reduzierenden Substanzen, durch den toxischen Effekt, den Einfluß auf die Osmose und die Veränderung des pH-Wertes erklärt. Die Nutzbarmachung von Kohlenhydraten wurde jedoch bestätigt.

4. Phosphatpuffer: Kulturen mit Phosphatpuffern zeigten ein geringeres Wachstum als solche ohne Puffer. Nach Whiteley und Frazier reagierte Glukose beim Erhitzen mit Phosphaten und hinderte so das Wachstum.

5. pH-Wert: In Kulturen, die trotz Verwendung von Phosphatpuffern ein üppiges Wachstum zeigten, war der pH-Wert nach drei Wochen bis zu 6,5 abgesunken. Ohne Verwendung von Puffersubstanzen zeigten Kulturen mit gutem Wachstum einen pH-Endwert bis 5,0. Schon Weiss und Wilkes-Weiss hatten ein Absinken des pH-Wertes festgestellt, wobei sich in ihren Kulturen die Treponemen bei einem pH von 6,1 morphologisch stark verändert hatten. Im Plasmamedium zeigte sich trotz des starken Absinkens des pH-Wertes keine morphologische Veränderung. Trotzdem empfahlen Rose und Morton eine Konstanterhaltung durch Phosphatpuffer und ein Zufügen steriler Glukoselösung zum Nährmedium nach der Sterilisation im Autoklaven.

6. Agar: Bei einem Agarzusatz von 0,05—0,2 % war das Wachstum um weniges geringer als ohne Zusatz, höhere Konzentrationen dem Wachstum aber schädlich. Außerdem zeigten die Tr. p. bei Agarzusatz eine größere Tendenz zur Spontan-Agglutination (auch nach Gelperin), wodurch Differenzierung und Auszählung erschwert wurden.

Es waren Eagle, Steinman und Oyama, die sich bemühten, die für die Reiter-Spirochäten gefundenen Wachstumsfaktoren auch genau chemisch zu definieren, oder soweit dieses nicht möglich war, die Faktoren durch andere chemisch bekannte Substanzen zu ersetzen. Es

gelang ihnen in jahrlangen Versuchen, ein Nährmedium zu finden, das ausschließlich chemisch definierbare Ingredienzen enthielt, und ermöglichten damit, die Stoffwechselvorgänge exakt zu verfolgen.

Der von Eagle und Steinman 1948 verwendete Nährboden bestand aus:

1. 15,00 g/L Trypticase
   0,75 g/L l-Cystein
   5,00 g/L Glukose
   5,00 g/L Hefeextrakt
   2,50 g/L NaCl
   0,50 g/L Na-Thioglykollat
   1,00 mg/L Resazurin oder Methylenblau
   0,75 g/L Agar
2. 10,00 % Kaninchen- oder Menschenserum, durch Glasfilter filtriert und bei 60—63° C für 1—2 Std. inaktiviert

Der pH-Wert betrug 6,8—7,2. Die Kulturen wurden bei 37° C im Anaerobenapparat nach Brewer in H_2-Atmosphäre bebrütet. Um die Wuchsstoffe zu finden, wurde der Nährboden soweit verdünnt, bis das Wachstum aufhörte. Mutmaßlich waren damit ein oder mehrere der nötigen Ingredienzen unter der für das Wachstum erforderlichen Konzentrationsschwelle. Verschiedene Substanzen wurden dann durch Zusatz zu dem Basalmedium auf ihre Wuchseigenschaften geprüft:

1. Als einzige von 43 Aminosäuren und verwandten Verbindungen wurde mit Arginin in ansteigender Konzentration bis zu 1,6 % ein gesteigertes Wachstum erreicht. Die relativ große Menge dieser Aminosäure, die nötig war, diesen Effekt im Vergleich zur Größe der Wachstumszunahme zu erzielen, ließ Eagle und Steinman vermuten, daß sie nur für eine unbekannte Komponente an deren Stelle trat.
2. Bei Verwendung von dialysiertem Serum fand kein Wachstum statt, dagegen ergab sich bei Zusatz von Serumultrafiltrat oder von dem nicht dialysierbaren Serumanteil ein Einsetzen des Wachstums. Das Serum hatte danach wenigstens zwei verschiedene Faktoren, wovon einer dialysierbar im Ultrafiltrat vorhanden war und einer in dem nicht dialysierbaren Serumanteil. Nur beide Komponenten zusammen führten im Nährmedium zu einem Wachstum. Die dialysierbare Komponente ließ sich durch Essigsäure (Na-Acetat) und verwandte niedermolekulare aliphatische Säuren ersetzen, die nicht dialysierbare Komponente durch kristallines Rinderalbumin.

Die wachstumsfördernden Eigenschaften von Na-Acetat und Arginin wirkten sich jedoch nur in Anwesenheit weiterer Wachstumsfaktoren aus:

3. Im Na-Thioglykollatmedium mußte mindestens noch eine nicht identifizierte Komponente enthalten sein, da zum Wachstum Hefeextrakt, Trypticase und Glukose notwendig waren.
4. Kristallines Rinderalbumin enthielt mindestens einen Wachstumsfaktor, wobei die Rolle des Serums für das Wachstum immer noch ungeklärt blieb. (Schutzeigenschaften?)

5. Zum Wachstum waren weiterhin Cystein oder eine Reihe von schwefelhaltigen Verbindungen (mit Ausnahme des Methionins) nötig. In den Versuchen wurde gezeigt, daß die Funktion des Cysteins nicht allein in der Herstellung der Anaerobiose bestehen konnte.

Keinen Wachstumseffekt hatten die Phosphatpuffer, die lediglich den Zweck der Konstanterhaltung des pH-Wertes erfüllten.

Die unbekannten Komponenten im Nährmedium waren demnach enthalten:

a) Im kristallinen Serumalbumin.

b) In Trypticase, Hefeextrakt und Glukose des Na-Thioglykollat-mediums.

Little und Subbarow wie auch Whiteley und Frazier hatten gefunden, daß ein Gemisch von Vitaminen so gut wie Glukose in Kombination mit einem Säuerungsprodukt des Kaseins („acid digest of casein") für das Wachstum notwendig waren. Die Ergebnisse ließen vermuten, daß das Na-Thioglykollatmedium durch seinen Gehalt an Hefeextrakt und Glukose aktiv sei. Steinman und Eagle fanden jedoch 1950, daß das enzymatische Kasein-Hydrolysat in Verbindung mit anderen Wuchsstoffen (Arginin, Na-Acetat, einer -SH- haltigen Verbindung und kristallines Rinderalbumin) das Na-Thioglykollatmedium ersetzte und daß zugefügte Vitamine und Glukose dann nicht notwendig waren. Drei Wachstumsfaktoren, die in dem enzymatischen Kasein-Hydrolysat (Fabrikpräparate „Trypticase" und „Amigen"), wie auch im Roh-Kasein und in anderen Peptonen enthalten waren, wurden entdeckt:

1. Pantothensäure,
2. Glutamin,
3. l-Phenylalanin.

Dennoch war zum Wachstum immer noch eine ganz geringe Menge Amigen notwendig, so daß das Nährmedium schließlich folgende Zusammensetzung aufwies:

0,10 ccm 0,1 %iges Pantothen-Calcium
0,25 ccm Glutathion oder Cystein
0,10 ccm l-Phenylalanin
0,20 ccm Glutamin
1,50 ccm l-Arganin
1,50 ccm Na-Acetat
0,50 ccm 5 %iges kristallines Rinderalbumin
0,50 ccm Phosphatpuffer pH 7,4
0,25 ccm Ascorbinsäure oder Na-Thioglykollat
0,10 ccm 0,01 %iges Amigen oder Trypticase

Die Tatsache des Wachstums ohne Hefeextrakt schloß nicht aus, daß dieser keine Wachstumsfaktoren enthielt. Tatsächlich konnte der Hefeextrakt einen Vitaminfaktor (= Pantothensäure) ersetzen, und es erfolgte das gleiche Wachstum, wenn außer dem Hefeextrakt im Nährmedium Glutamin und Phenylalanin enthalten waren. Auch im Ganzen ließ sich der Hefeextrakt durch folgende chemisch definierbare Vitamine ersetzen: p-Aminobenzoesäure, Biotin, Cholin, Folsäure, Inositol, Niacin, Pantothensäure, Pyridoxin, Riboflavin und Thiamin.

Danach ergaben die Versuche:

1. Der Vitamin B-Komplex war für das Wachstum notwendig.
2. Das enzymatische Protein-Hydrolysat konnte in entsprechender Konzentration diese Vitamine ersetzen.
3. Die aktivste Komponente aus dem Vitamin B-Komplex war die Pantothensäure, die in Anwesenheit einer Schwellenkonzentration von Amigen alle anderen Vitamine ersetzen konnte.
4. Die für das Wachstum erforderliche geringe Amigenmenge konnte durch Zusatz der Vitamine weiter verringert werden.
5. Es gelang mit Glutamin und Phenylalanin den Amigen-Schwellenwert noch weiter herabzusetzen.

1952 versuchten Steinman, Eagle und Oyama in ihrem „amigenfreien" Medium Reiter-Spirochäten zu züchten, wobei sie den Amigen-Schwellenwert durch bestimmte Aminosäuren, Vitamine, Purine, Pyrimidine und anorganische Ionen zu ersetzen suchten. Eine große Anzahl von Substanzen der angeführten Gruppen vermochten gemeinsam den Amigenrest zu ersetzen. In nachfolgenden Untersuchungen über das Stickstoffbedürfnis der Reiter-Spirochäten fanden sie, daß von allen Substanzen, die im Nährmedium den Amigenrest ersetzen konnten, für das Wachstum nur notwendig waren:

Aminosäuren: Arginin, Asparaginsäure, Cystin oder Cystein, Glutaminsäure oder Prolin, Histidin, Isoleucin Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Valin.

Pyrimidine: Cytosin oder Uracil.

Anorg. Ionen: NH_4^+ in großen Mengen, welche sich nur durch Glutamin ersetzen ließen.

Fehlte im Nährmedium nur einer dieser Stoffe, so trat ein rapider Wachstumsabfall ein.

1953 gelang es Oyama, Steinman und Eagle, die letzte im kristallinen Rinderalbumin enthaltene unbekannte Komponente ihres Nährmediums zu finden. Sie gingen bei ihren Versuchen so vor, daß sie das handelsübliche kristalline Rinderalbumin (welches durch einen Lipoid-Protein-Komplex ersetzbar war) in Lipoid- und Proteinfraktionen zerlegten. Jede der beiden allein war inaktiv, beide kombiniert aktiv für das Wachstum der Reiter-Spirochäten. Sie bewiesen, daß das Proteid nur eine entgiftende und bindende Rolle für das wichtige Lipoid spielte und nicht ein eigener Wachstumsfaktor war. Das aktive Lipoid konnte ersetzt werden durch die Oelsäure, durch eine Anzahl ungesättigter Fettsäuren und durch relativ wenige gesättigte Fettsäuren. Eine Reihe von Proteinen wurde untersucht im Hinblick auf die Möglichkeit Oelsäure zu entgiften, und diese Eigenschaft wurde nur beim kristallinen ß-Lactoglobulin gefunden. Jedes der Eiweißmoleküle war in der Lage, 3-6 Moleküle Oelsäure fest genug zu binden, um deren bakteriostatischen oder hämolytischen Effekt zu verhindern. Das molare Verhältnis von Lipoid zu Protein durfte nicht höher als 1 : 4 sein, da sonst das Wachstum stark abfiel. Die Funktion des Serumalbumins beim Stoff-

wechsel der Reiter-Spirochäten schien demnach ähnlich wie beim Mycobacterium tuberculosis zu sein (Davis und Dubos).

b) Versuche einer Kultivierung des virulenten Treponema pallidum

Alle Versuche eine Fortpflanzung des virulenten Tr. p. in einem Nährboden zu erreichen, der sich als geeignet für die Züchtung der Kulturstämme des Tr. p. erwiesen hatte, sind bisher fehlgeschlagen. Auch die Bemühungen in den letzten Jahren von Whiteley und Frazier und von Rose und Morton, die ihre für Reiter-Spirochäten optimalen Nährböden verwendeten und zusätzlich die Kulturen in einer Atmosphäre aus 90 % N_2 und 10 % CO_2 bebrüteten, ergaben nur ein Überleben der Treponemen bis zu 24 Stunden.

Nelson konnte 1948 die Zusammensetzung eines Nährmediums veröffentlichen, in dem es gelang, Tr. p. bis zu 192 Std. beweglich und virulent zu erhalten. Als Ausgangsmaterial verwendete er den virulenten Nichols-Stamm des Tr. p. vom Kaninchen, da menschliches Gewebe zu sehr verunreinigt, der Nichols-Stamm jedoch — wie durch Laboratoriumsinfektionen erwiesen — für den Menschen noch kontagiös war. Der beimpfte Hoden wurde dem Tier 24—48 Std. nach dem ersten Auftreten einer klinisch erkennbaren Orchitis entnommen, in 0,85 %iger NaCl-Lösung bei 30° C in CO_2-Atmosphäre (5 %) ausgewaschen und die erhaltene Treponemensuspension in das Nährmedium verimpft. Nach Nelson konnten die Treponemen ihre Beweglichkeit erhalten, wenn das Nährmedium wie folgt zusammengesetzt war:

40,00 % Kristallines Rinderalbumin, 10 %ig
12,50 % Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 und KH_2PO_4)
0,65 % Na-Thioglykollat, 1,5 %ig
2,50 % Cystein-HCl, 0,63 %ig
2,50 % Glutathion, 0,001 %ig
1,00 % Na-Pyruvat, 0,69 %ig
5,80 % Na-Bicarbonat, 1,26 %ig
30,05 % NaCl, 0,85 %ig
4,00 % Gewebeextrakt oder Serumultrafiltrat
1,00 % Vitaminlösung: Thiamin, Niacin, Pantothen-Ca, Pyridoxin, Riboflavin, Cholin, Inositol, Biotin und Folsäure.

Die Anaerobiose wurde durch Bebrütung bei 5 % CO_2 und 95 % N_2 („Brewer anaerobic jar") und durch Zusatz von Na-Thioglykollat zum Medium erreicht. Als Bebrütungs-Temperatur erwies sich 30° C am günstigsten. Der optimale pH-Wert lag bei 7,0, seine Konstanterhaltung wurde durch zweistündiges Durchleiten von CO_2 durch das Medium vor der Beimpfung und durch Zusatz von Phosphatpuffern erreicht. Es zeigte sich, daß bei einem Überleben der Tr. p. von mehr als vier Tagen ein Längenwachstum zu bemerken war, jedoch keine Vermehrung. Bei der Untersuchung chemischer und physikalischer Faktoren, die einen Einfluß auf das Erhalten der Virulenz ausübten, fand sich:

1. Ein günstiger Effekt des CO_2-Bicarbonatsystems, welches durch Zusatz von Na-Pyruvat zum Medium und N_2-Atmosphäre ersetzt werden konnte. Fehlte das Bicarbonat, mußte neben dem Pyruvat auch Oxalacetat zugesetzt werden.

2. Eine gute Wirkung von anorganischem Phosphat in Verbindung mit dem CO_2-Bicarbonatsystem.
3. Ohne Zusatz von Gewebeextrakt oder Serumultrafiltrat und kristallinem Rinderalbumin war kein Überleben der Tr. p. möglich.
4. Glutathion und Cystein hatten kombiniert eine um das Doppelte höhere Wirksamkeit als wenn sie allein dem Medium zugesetzt wurden.
5. Pyruvat wirkte in Verbindung mit Bicarbonat — im Gegensatz zu Succinat oder Citrat — lebensverlängernd auf die Tr. p.
6. Ascorbinsäure wirkte hemmend auf das Wachstum.
7. Keinen Wachstums- oder Überlebenseffekt hatten Aminosäuren (Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan, Valin, Phenylalanin, Histidin, Arginin, Isoleucin) oder Trypticase. Desgleichen nicht Agar, Na-Acetat, p-Aminobenzoesäure und Dextrose.

Erst als Nelson und Mayer 1949 den Treponema pallidum — Immobilisierungstest (T. P. I.-Test) entwickelt hatten, erlangte das Nährmedium eine praktische Bedeutung. Es wurde versucht, diese kompliziert herzustellende Nährlösung zu vereinfachen.

Nelson und Diesenbruck gaben folgende Modifikation an, in der das Vitamingemisch überflüssig wurde:

50,00 % Rinderalbumin Fraktion V, 5 %ig in 0,85 % NaCl
15,65 % Puffergemisch pH 7,0
3,00 % Na-Thioglykollat, 1,5 %ig in Aqua bidest.
3,15 % Cystein, 0,63 %ig in 0,85 % NaCl
3,15 % Glutathion, 1,23 %ig in 0,85 % NaCl
1,55 % Na-Pyruvat, 1,0 %ig in 0,85 % NaCl
5,65 % Na-Bicarbonat, 1,26 %ig in Aqua bidest.
11,60 % NaCl, 0,85 % in Aqua bidest.
6,25 % Rinderserum-Ultrafiltrat.

Saurino gab eine Modifikation an, die im wesentlichen in einer Erhöhung des Zusatzes an Rinderserum-Ultrafiltrat bestand und in welcher virulente Tr. p. angeblich für zwei Monate überleben konnten. Er erprobte die verschiedenen Pyruvate, ohne jedoch einen bemerkenswerten Unterschied feststellen zu können. Dagegen erwies sich das Rinderserum-Ultrafiltrat dem Menschenserum- oder Kaninchenserum-Ultrafiltrat oder dem Menschen-, Kaninchen- und Meerschweinchen-Normalserum in der Wirkung überlegen. Das Nährmedium nach Saurino bestand aus:

35,0 ccm Rinderalbumin Fraktion V, 10 %ig in 0,85 % NaCl
6,2 ccm Phosphatpuffer ($Na_2HPO_4 . 7\,H_2O$ und KH_2PO_4)
0,8 ccm Cystein-HCl, 1,26 %ig in 0,85 % NaCl
30,0 ccm Rinderserum-Ultrafiltrat
6,0 ccm Pyruvat-Bicarbonat, Na-Pyruvat 1,0 %ig, $NaHCO_3$ 1,26 %ig
2,0 ccm NaCl, 0,85 %ig in Aqua bidest.

Portnoy, Harris und Olansky vergrößerten den Zusatz an Na-Thioglykollat, indem sie die gesamte 0,85 %ige NaCl-Lösung

durch dieses Reduktionsmittel ersetzten. Sie erreichten damit eine weitere Verminderung des Sauerstoffgehaltes im Nährmedium, blieben aber noch unter dem toxischen Schwellenwert des Na-Thioglykollates. Sie konnten die Tr. p. in einem Nährmedium beweglich erhalten aus:

50,00 % Kristallines Rinderalbumin oder Rinderalbumin Fraktion V, 5 %ig in 0,85 % NaCl
15,65 % Phosphatpuffer, Na_2HPO_4, 3,58 %ig in Aqua bidest. KH_2PO_4, 2,04 %ig in Aqua bidest.
14,60 % Na-Thioglykollat, 1,5 %ig in Aqua bidest.
3,15 % Glutathion, 1,23 %ig in 0,85 % NaCl
3,15 % Cystein-HCl, 0,63 %ig in 0,85 % NaCl
1,55 % Na-Pyruvat, 1,0 %ig in 0,85 % NaCl
5,65 % Na-Bicarbonat, 1,26 %ig in Aqua bidest.
6,25 % Rinderserum-Ultrafiltrat.

Die verschiedenen Modifikationen des von Nelson angegebenen Basalmediums finden heute in den Laboratorien Verwendung, die den T. P. I.-Test durchführen, wobei die Treponemenaufschwemmungen anaerob in einem Gasgemisch von 95 % N_2 und 5 % CO_2 bei 35 ° C aufbewahrt werden.

Rice und Nelson konnten 1951 aus Rinderserum einen Überlebensfaktor in Form einer Isopropylidengruppe isolieren, durch die sich Rinderserum-Ultrafiltrat oder Hodenextrakt im Basalmedium ersetzen ließ. Diese durch Vitamine, Aminosäuren, Purine, Pyrimidine, Glukose und andere Zucker zu ersetzen mißlang.

Da Boak, Fawcett und Carpenter keinen nennenswerten Erfolg mit ihren Versuchen hatten, das Tr. p. in bebrüteten Hühner- und Enteneiern fortzupflanzen (bis zu 12 Tagen Beweglichkeit der Tr. p.), setzten sie ihre Versuche mit einem künstlichen Nährmedium fort. Als Ausgangsmaterial verwendeten sie Kaninchenhoden, die 27—39 Tage vorher mit verschiedenen virulenten Stämmen des Tr. p. infiziert worden waren. Die Treponemenaufschwemmungen verimpften sie in ein Nährmedium aus:

20,0 g/L Pepton (Trypticase)
10,0 g/L Dextrose
2,0 g/L Dinatriumphosphat
5,0 g/L NaCl
1,0 g/L Na-Thioglykollat
0,002 g/L Methylenblau
0,5 g/L Agar
10,0 % Serum (Hühner-, Enten-, Gänse-, Rinder-, Schweineserum)

Die Kulturröhrchen wurden fest verschlossen und bei 30° C bebrütet. Subkulturen erhielten die Untersucher durch Überimpfung von 0,1 ccm in frische Kulturröhrchen. Von zahlreichen Aminosäuren und verwandten Verbindungen, Fettsäuren und Vitaminen zeigten allein Citrullin und d,l-Ornithin eine Verbesserung des Wachstumseffektes. Es fand sich also keine Übereinstimmung mit den von Eagle und Steinman für die Reiter-Spirochäten gefundenen Ergebnissen, obwohl beide Substanzen dem Arginin nahe verwandt sind. Eine Beweglichkeit der Treponemen war in den Originalkulturen 34—97 Tage nachweisbar, in

der 1. Subkultur 25—87 Tage in der 2. 23 Tage und in der 3. Subkultur 11 Tage. In keinem Fall gelang es jedoch, die Virulenz der Tr. p. im Tierversuch nachzuweisen (Überimpfung von 19, 34 und 97 Tage alten Kulturen), so daß sich auch bei diesen Ergebnissen die Frage erhob, ob es sich tatsächlich um die Züchtung von Treponemata pallida gehandelt habe.

Hard fügte, nachdem alle Versuche Tr. p. auf tierischen Nährlösungen zu züchten keinen Erfolg brachten, seiner Basisnährlösung pflanzliche Wachstumsfaktoren zu:

1. Hetero-Auxin (Indol-3-Essigsäure),
2. Tomatensaft,
3. Rohe Kartoffelstückchen.

Das verwendete Basalmedium wies folgende Zusammensetzung auf:

1,5 % Agar
0,5 % Pepton
1,0 % Dextrose
47,0 % Fleischextrakt aus Rinderherz
50,0 % Ringerlösung

Der virulente Nichols-Stamm zeigte keine Vermehrung sondern nur ein Überleben bis zu drei Tagen. Auf den rohen Kartoffelstückchen konnte ein Wachstum von avirulenten Spirochäten für mehrere Wochen beobachtet werden.

c) Vergleich der Wachstumsfaktoren des Treponema pallidum und seiner Kulturstämme

Abgesehen von den Unterschieden in der Morphologie, Teilungszeit, Virulenz, optimalen Inkubationstemperatur usw., ergibt sich bei einer Gegenüberstellung der nach neuesten Erkenntnissen erforderlichen Wachstumsfaktoren der Tr. p. und deren Kulturstämmen eine nur geringe Übereinstimmung. Es ist schwer zwischen denjenigen Faktoren zu unterscheiden, die für das Wachstum unbedingt notwendig, und solchen, die nur günstig sind oder deren Zusatz das Wachstum weder in positivem noch in negativem Sinne beeinträchtigt. Die Wirksamkeit dieser einzelnen Faktoren hängt ganz von der Zusammensetzung des Nährmediums ab, da sich viele gegenseitig ersetzen oder in Anwesenheit von chemisch nicht genau definierbaren Substanzen wie Hefeextrakt, Trypticase und Rinderalbumin nicht mehr notwendig erscheinen. Nachdem die Wachstumsfaktoren für die Kulturspirochäten bekannt, eine genaue chemische Definition der nutritiven Erfordernisse und der Stoffwechselvorgänge nur eine Frage der Zeit sein dürfte und eine Anwendung der bisherigen Erkenntnisse auf die Kultivierung des virulenten Tr. p. bisher ohne Erfolg war, erscheint es mehr als fraglich, ob es gelingt, auf dem Weg über die Züchtung der Kulturspirochäten eine Methode der Fortpflanzung für die T. p. zu entwickeln.

Tabelle 2

Wachstumsfaktoren	Kulturspirochäten	Tr. p.
Enzymatisches Kasein-Hydrolysat (Amigen), Trypticase)	+	ϕ
Faktor: Pantothensäure	+	+
Glutamin	+	ϕ
1-Phenylalanin	+	ϕ
Hefeextrakt	+	ϕ
Faktor: Pantothensäure	+	+
Rinderserum	+	+
a. Serum-Ultrafiltrat	+	+
Faktor: Na-Acetat	+	ϕ
b. Kristallines Rinderserum	+	+
Faktor: Lipoid-Ölsäure	+	–
Protein-ß-Lactoglobulin	+	–
Aminosäuren		
Arginin	+	ϕ
Asparaginsäure	+	–
Cystin, Cystein	+	+
Glutaminsäure, Prolin	+	–
Histidin	+	ϕ
Isoleucin	+	ϕ
Lysin	+	ϕ
Methionin	+	ϕ
Phenylalanin	+	ϕ
Threonin	+	ϕ
Tryptophan	+	ϕ
Valin	+	–
Serin	+	–
Tyrosin	+	–
Leucin	+	ϕ
Pyrimidine		
Cytosin, Uracil	+	–
Thymin	+	–
Purine		
Adenin	+	–
Anorganische Ionen		
NH_4	+	–
Vitamine		
Ascorbinsäure	+	ϕ
Cholin	+	+
Niacin	+	+
Pantothensäure	+	+
Pyridoxin	+	+
Riboflavin	+	+
Thiamin	+	+
p-Aminobenzoesäure	+	ϕ
Biotin	+	+
Folsäure	+	+
Inositol	+	+
Schwefelhaltige Verbindungen		
Cystein	+	+
Glutathion	+	+
Na-Thioglykollat	+	+
Reduktionsmittel		
Na-Thioglykollat	+	+
Ascorbinsäure	+	ϕ
Glukose	+	ϕ
Pyruvat	ϕ	+
Bicarbonat	ϕ	+

Zeichenerklärung: + = für Wachstum unbedingt notwendig oder bei bestimmter Zusammensetzung des Mediums günstig
ϕ = kein Wachstumseffekt
– = keine Untersuchungsergebnisse bekannt

II. Kultivierungsversuche auf tierischen Nährböden

a) Der virulente Nichols-Stamm

Neben den Gewebenährböden hatte sich auch die Chorionallantoismembran des lebenden Hühnereies als günstiger Nährboden für die Züchtung von Virusarten und Spirochäten (Borrelia duttonii und Leptospira icterohaemorrhagiae) erwiesen.

Als erste versuchten 1938 Bessemans und de Meirsman das Tr. p. auf diesem Wege zu kultivieren. Das Ergebnis war negativ.

1939 implantierten Sterzi und Staudacher Gewebestücke von treponemenhaltigen Kaninchenhoden in die Chorionallantoismembran von Hühnereiern, die 150 Std. bei 37° C bebrütet worden waren. Nach 24 Std. fanden sie schwach bewegliche Tr. p. in Nähe der Implantationsstelle, die sich bei Überimpfung auf Kaninchen als apathogen erwiesen. Ein positives Ergebnis ergaben lediglich die schon nach 2 Std. nach Implantation auf Kaninchen überimpften Tr. p. Allerdings konnte bei Kontrollen nach verschiedenen Zeitabschnitten die Auswanderung der Tr. p. aus dem Ort der Implantation nachgewiesen werden, wobei in einem Fall eine gut bewegliche Spirochäte in der Leber eines Hühnerembryonen gefunden wurde.

Callaway und Sharp veröffentlichten 1941 die Beschreibung einer gelungenen Überimpfung von Kaninchenhoden auf die Chorionallantoismembran eines 10 Tage bei 38° C bebrüteten Hühnereies und fanden 27 Std. nach weiterer Bebrütung bei 38° C schwach bewegliche Treponemen, die als Suspension in Kaninchenhoden überimpft, nach 59 Tagen eine im Dunkelfeld überprüfte spezifische Orchitis auslösten.

Wile und Snow berichteten im gleichen Jahr über zwei weitere erfolgreiche Versuche. Sie verwendeten Hühnereier, die 11—12 Tage bei 38° C bebrütet waren. Nach weiterer achttägiger Bebrütung der mit treponemenhaltigen Kaninchenhoden inokulierten Eier waren zwar im Dunkelfeld keine Tr. p. nachweisbar, jedoch ergab die intratestale Verimpfung von Chorionallantoismembran und Embryogewebe in zwei Fällen syphilitische Hodenveränderungen.

Wile und Johnson nahmen 1943 für ihre Versuche ebenfalls 10—13 Tage bei 38—39° C bebrütete Hühnereier und beimpften die Chorionallantoismembran mit 3—5 Tropfen einer isotonischen Kochsalzlösung, in der ein syphilitischer Kaninchenhoden ausgewaschen worden war. Zur Kontrolle wurden 0,5 ccm des gleichen Materials intratestal weiterverimpft. Die Eier wurden ohne Lageveränderung 8 Tage bei 38° C bebrütet. Bei Dunkelfeldkontrolle erwiesen sich Chorionallantoismembran, Herz, Leber und Brustmuskel als negativ. Die intratestale Überimpfung von 0,7 ccm einer Aufschwemmung dieses Materials ergab nach späterer Exstirpation des Hodens bewegliche Tr. p. im Dunkelfeld, die mit gutem Erfolg über Kaninchenhoden weitergezüchtet werden konnten.

Rowe und Curtis sahen bei für 7 Tage bei 33° C bebrüteten Eiern bewegliche Tr. p., die bei Inokulation in Kaninchenhoden Syphilome

erzeugten. Im Verlaufe dieses Experimentes konnten sie mehrere Passagen vom Kaninchen zu Eiern und zurück erreichen. Die Eier waren vor der Implantation 6—11 Tage bei 37—38° C unter täglicher Drehung bebrütet, die zur Inokulation verwendeten Hoden 29—89 Tage vorher mit einem Nichols-Stamm infiziert worden.

Hard verimpfte 1952 in einem ähnlichen Verfahren den Gent- und Nichols-Stamm in Hühnereier und den Nichols-Stamm in Gänseeier. Weder im Dunkelfeld, noch bei Quecksilber- oder Silberfärbung gelang es ihm Tr. p. nachzuweisen. Jedoch erhielt er in einem Fall bei einem Kaninchen syphilitische Erscheinungen.

Aus den oben beschriebenen Experimenten geht hervor:

a) Daß es für das Wachstum des Nichols-Stammes im Kaninchenhoden einen optimalen Zeitpunkt der Überimpfung auf Hühnerembryonen zu geben scheint, auch wenn im Dunkelfeld zu einem für die Verimpfung ungünstigen Zeitpunkt Tr p. nachzuweisen sind. (In den Versuchen von Wile und Johnson ergab ein nach 53 Tagen verimpfter Hoden ein positives, der andere 8 Tage später verimpfte Hoden des gleichen Tieres ein negatives Resultat — Antikörperbildung?)

b) Daß die Feststellung einer geglückten Übertragung vom Ei auf das Tier, ohne daß sich im Impfmaterial Tr. p. nachweisen lassen, eine ultramikroskopische Phase eines Lebenscyclus vermuten ließ (Wile und Snow, Wile und Johnson, Hard). Ein Beweis für das Vorhandensein eines Lebenscyclus ist diese Feststellung allerdings nicht, da Magnuson ja demonstrierte, daß bereits in 47 % der Fälle 1—2 Tr. p. genügen, um eine syphilitische Infektion hervorzurufen.

c) Daß eine tatsächliche Vermehrung der Tr. p. im Hühnerei nicht bewiesen ist (Rowe und Curtis). Die Möglichkeit, daß die Tr p. lediglich überleben und so zu einer positiven Verimpfung am Tier führen, ist nicht von der Hand zu weisen (Hard).

b) Der avirulente Nichols- und Kazan-Stamm

In toten menschlichen Embryonen leben und vermehren sich die Tr. p. Lebendes und embryonales Gewebe schien demnach nicht für das Wachstum notwendig zu sein. In der Literatur sind drei Kultivierungen von avirulenten Tr. p.-Stämmen im bebrüteten Hühnerei unter anaeroben Bedingungen beschrieben.

Es gelang 1949 Newcomer und Haanes als ersten, einen apathogenen Nichols-Kulturstamm in 10 Tage alten Hühnerembryonen unter anaeroben Bedingungen zu züchten. Der Nichols-Stamm wurde im Na-Thioglykollatmedium mit Zusatz von 10 % Ascites bei 37° C gehalten. Je 1,0 ccm Treponemenaufschwemmung wurde in die lebenden Hühnerembryonen verimpft, wobei sich das beste Wachstum im Dottersack ergab. Die Bebrütung erfolgte in einem Gasmilieu von 10 % CO_2

und 90 % H_2 (modifizierte Methode nach Rosenthal), in dem die Embryonen innerhalb weniger Stunden abstarben. Kontrollen erfolgten zwischen 2—10 Tagen, wobei den Embryonen je 1,0 ccm Material entnommen und dieses auf neue Embryonen verimpft oder im Na-Thioglykollatmedium weitergezüchtet wurde.

Ein Jahr später berichteten Haanes, Wiggall und Delamater, daß sie mit gleicher Züchtungsmethode — unter Verwendung des gleichen Nährbodens und unter gleichen anaeroben Verhältnissen — den apathogenen Kazan-Stamm des Tr. p. züchten konnten. Subkulturen erhielten sie in der oben beschriebenen Weise.

c) Der Reiter-Stamm

Fast zur gleichen Zeit, da Newcomer und Haanes über ihren Erfolg der anaeroben Züchtung des avirulenten Nichols-Stammes berichteten, gelang es Beardmore und Dodd den Reiter-Stamm im bebrüteten Hühnerei zu züchten. Zur Verimpfung gelangten 4 Tage alte Kulturen, die im Na-Thioglykollat-Medium nach Brewer gezüchtet waren. Die 10 Tage alten lebenden Hühnerembryonen wurden mit verschiedenen Mengen Material geimpft und die Eier sofort mit einem Paraffinmantel umgeben. Unter diesem starben die Embryonen innerhalb weniger Stunden ab. Es ergab sich in allen Fällen eine Vermehrung von morphologisch typischen Reiter-Spirochäten, die im Na-Thioglykollat-Medium in gewohnter Weise weitergezüchtet oder auch auf andere Eier übertragen werden konnten.

Die Untersucher beschäftigte vor allem die Frage, ob der Wachstumsfaktor in dem toten Embryo oder in der anaeroben Bebrütung zu suchen war. Durch ihre Versuche erschien es erwiesen, daß allein die Anaerobiose der ausschlaggebende Faktor für die Vermehrung der Reiter-Spirochäten im Hühnerei war.

Im Vergleich mit den zuvor beschriebenen fraglichen Erfolgen bei der Züchtung des virulenten Nichols-Stammes unter aeroben Bedingungen, könnte die Anwendung der zuletzt geschilderten anaeroben Verhältnisse vielleicht zu einer Vermehrung dieser Treponemen im Hühnerei führen.

III. Züchtung auf Gewebenährböden

Ermutigt durch die erfolgreiche Kultivierung von verschiedenen Virusarten und von Rickettsien in Nährmedien, die lebende und wachsende Gewebezellen enthielten, versuchten schon 1933 Kast und Kolmer die Züchtung in Gewebenährböden, obwohl andere Untersucher früher über negative Ergebnisse berichtet hatten. Sie verwendeten als Ausgangsmaterial einen konzentrierten Extrakt eines Syphiloms vom Kaninchenhoden, und zwar in einem Stadium, in dem sich erfahrungsgemäß eine große Menge von Treponemen extrahieren ließ und verimpften diese Treponemensuspension in:

1. Normales Kaninchenserum und Tyrodelösung,
2. 10%ige Lösungen der verschiedenen Gewebeextrakte von Kaninchenmilz, Kaninchenhoden, 15—18 Tage alten Kaninchenembryonen und 9—11 Tage alten Hühnerembryonen.

Die Bebrütung erfolgte sowohl bei 32—34° C als auch bei 37—38° C. Die Treponemen zeigten zwar keine Vermehrung, behielten jedoch ihre Beweglichkeit und morphologische Struktur.

Ein Überleben des Tr. p. bis zu 10 Tagen in Gewebekulturen von explantierten Hoden neugeborener Kaninchen erreichte Perry. Er glaubte, daß das Überleben abhängig war von der Anwesenheit lebender Zellelemente, insbesondere von epithelialen Zellen des Hodens. Die Zahl der positiven Kulturen (5) war allerdings gering, so daß dieser Züchtungsmethode noch keine praktische Bedeutung zugestanden werden konnte.

Delacrétaz beschrieb ein Verfahren, in der Absicht, ein leichter herzustellendes Medium als das von Nelson für den T. P. I.-Test angegebene zu erhalten. Er erreichte ein Überleben von mindestens 70% der Tr. p. für 60—72 Stunden in einem Nährboden, bestehend aus 5% Mäuseembryonenextrakt, 10% Menschen- oder Hammelserum und 85% Tyrodelösung. (Stickstoffatmosphäre bei 35° C).

C. Eigene Versuche, ein Überleben der Treponemata pallida (Nichols-Stamm) in einem Placentanährboden zu erreichen

I. Bisherige allgemeine anaerobe Züchtungsverfahren

Nachdem es gesichert ist, daß das Tr. p. und die Kulturspirochäten zu den obligaten Anaerobiern zählen, liegt es nahe, auch die neueren Erkenntnisse in der Züchtung anaerob wachsender Bakterien mit für die Züchtung des Tr. p. zu verwerten. Das Fortner-Verfahren, bei dem die eine Hälfte einer Agarplatte mit Prodigiosusbakterien beimpft wird, die dann für die anaerob wachsenden Bakterien der anderen Nährbodenhälfte den Sauerstoff entziehen, die Züchtung im Anaerobentopf nach Zeissler, der Nährboden nach Tarozzi, wobei die darin enthaltenen Leberstückchen einerseits als reduzierende Substanz, andererseits als organische Sauerstoffquelle dienen, das Pyrogallolverfahren nach Koch und andere Verfahren haben seit Jahren ihren Platz in der Anaerobenzüchtung behauptet und wurden auch für die Züchtung der Tr. p. versucht. Mit teilweisen Modifikationen gelang hierdurch die Züchtung von Reiter- und anderen Kulturspirochäten.

Wenn auch die Kultur der Anaerobier möglich war, so ist die Erkenntnis der Atmungsvorgänge ein Forschungsergebnis neuerer Zeit. Nach der Wielandschen Theorie beruhen die Oxydationsvorgänge in

den Zellen nicht in einer Anlagerung von Sauerstoff, sondern auf einer Abspaltung von Wasserstoff und dessen Übertragung auf Wasserstoffakzeptoren. Bei dieser Dehydrierung wirken Fermente (Redoxasen, Dehydrasen, Zytochrome, das gelbe Atmungsferment) als Katalysatoren, d. h. als Wasserstoffüberträger. Die gleiche Aufgabe erfüllen ferner noch einige Redoxverbindungen wie die l-Ascorbinsäure, das Glutathion und das Cystein (Sulfhydrylverbindungen). Der aus dem Molekül freiwerdende Wasserstoff verbindet sich mit dem molekularen Sauerstoff, der auch als Wasserstoffakzeptor fungieren kann, zu dem Reduktionsprodukt Wasserstoffsuperoxyd, das als starkes Zellgift durch das Ferment Katalase sofort in Wasser und Sauerstoff gespalten wird. Bei den Anaerobiern wird der Atmungsprozeß von den Dehydrasen und den Redoxverbindungen gesteuert. Erst bei Anwesenheit von Sauerstoff kommt es zur Bildung von H_2O_2, welches durch das Fehlen der Katalase nicht zerlegt werden kann und so die Anaerobier abtötet (Frei und Riedmüller).

Frei und Riedmüller erklären das Wachstum anaerober Keime in Organnährböden ohne Luftabschluß oder im lebenden sauerstoffhaltigen Gewebe durch die Wirkung reduzierender Substanzen (Redoxverbindungen) aus der Gruppe der Sulfhydrylverbindungen. Diese reduzieren unter Wasserstoffabgabe und Übergang in die Disulfidform den im Gewebe oder im Nährboden freien Sauerstoff zu Wasser, ehe es zur schädlichen Bildung von Wasserstoffsuperoxyd kommt. Bestätigt wird diese Tatsache, daß Anaerobier auch in Nährböden wachsen können, die als alleinigen Zusatz eine dieser Redoxsubstanzen haben (Thioglykolsäure, Cystein, Glutathion, Bernsteinsäure, l-Ascorbinsäure). Das gute Wachstum der Anaerobier in Anwesenheit frischen Blutes wird durch den Peroxydasegehalt des Hämoglobins erklärt, welches ja wie das Ferment Katalase wirkt.

So erscheint es einleuchtend, daß die Organe einen günstigen Einfluß auf das Anaerobenwachstum haben, die in vivo besonders stark in den Stoffwechsel eingeschaltet sind, wie die Leber, die Milz, die Niere oder die Placenta.

In Fällen einer negativen Wassermannschen Reaktion gelingt es Seba, im Venenblut Tr. p. nachzuweisen. Er verwendet den flüssigen Noguchi-Nährboden: Steriles Rinderserum (1 Std. bei 60° C inaktiviert) mit 0,5 % sterilem Placentarextrakt versetzt. Der pH-Wert beträgt 7,3, die Bebrütung erfolgt bei 37° C, die Anaerobiose wird im Exsiccator hergestellt. Auf 100 ccm Nährboden kommen 10 ccm Patientenblut (keine Antikoagulantien).

Da außer dem Hinweis von Seba in dem zugänglichen Schrifttum noch keine Züchtungsversuche mit einem Placenta-Nährboden, wohl aber solche mit Medien, die andere Stoffwechselorgane enthalten, beschrieben worden sind, wird in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, ein Überleben des virulenten Nichols-Stammes in diesem Nährmedium zu erreichen.

II. Eigene Methodik

a) Nährmedium

Frische Placenta wurde von Eihäuten, Nabelschnur und den großen Gefäßstämmen befreit, in Stücke entsprechend der Kotyledonengröße zerteilt und 1 Std. gewässert. Die gut abgetropften Placentastücke wurden mit gleicher Gewichtsmenge Leitungswasser versetzt, ½ Std. bei 60° C ziehen gelassen und weiter 1 Std. im Dampftopf gekocht. Die erhaltene Bouillon wurde von den Placentastücken abgegossen, mit 0,4 % NaCl, 0,2 % Dinatriumphosphat und 1,0 % Pepton Witte versetzt, auf pH 7,0 eingestellt, filtriert, sterilisiert und im Eisschrank aufbewahrt. Die Placentastücke wurden nach gründlichem Waschen und Entfernen der Reste der Chorionplatte in kleine Würfelchen geschnitten (Kantenlänge 2 mm), im Trockenschrank oberflächlich getrocknet, zu etwa 10—15 Würfelchen in Kulturröhrchen abgefüllt, sterilisiert und im Eisschrank aufbewahrt. Erst vor der Verimpfung wurde die jeweils notwendige Menge Placentabouillon in die Röhrchen mit den Placentastücken pipettiert und die Röhrchen zur Austreibung des Sauerstoffs aus dem Nährboden für 10 min im kochenden Wasserbad belassen.

b) Puffergemisch

Als zusätzliches Puffergemisch wurde bei einigen Versuchsreihen (Tabelle 3) verwendet:

3,58 ccm Na_2HPO_4, 3,58 %ig in Aqua bidest.
2,04 ccm KH_2PO_4, 2,04 %ig in Aqua bidest.
3 ccm dieses Puffergemisches wurde versetzt mit
1,00 ccm $NaHCO_3$, 1,26 %ig in Aqua bidest.

c) Impfmaterial

Zur Verwendung gelangte Hodengewebe von Kaninchen, die 9 bis 21 Tage vorher mit einem virulenten Nichols-Stamm infiziert worden waren. Der Hoden wurde jeweils 24 Std. nach den ersten klinischen Anzeichen einer Orchitis exstirpiert und wie zur Verwendung für den T.P.I.-Test vom Nebenhoden befreit, aufgeschnitten und in Placenta-Bouillon oder in 5 %igem Rinderserumalbumin reinst (Behring-Werke) in einer Extraktionsflasche im Wasserbad bei 35° C für etwa 20 min ausgeschüttelt. Von der Treponemensuspension wurden dann die Gewebebeimengungen abzentrifugiert und zwar 2 min bei 500 Umdr/min, 3 min bei 800 Umdr/min und 2 min bei 500 Umdr/min, um eine Sedimentierung der gröberen Bestandteile, nicht aber der Tr. p. zu erreichen.

d) Verimpfung und Inkubation

Jeweils 3 ccm Nährmedium wurden mit 1 ccm Treponemensuspension versetzt und zwar in den in Tabelle 3 angeführten Kombinationen. Die Kulturröhrchen wurden mit einer locker sitzenden Glaskappe verschlossen und in einer Atmosphäre aus 95 % N_2 und 5 % CO_2 für 18 Std. bei 35° C bebrütet.

Tabelle 3

Röhrchenbeschickung	1	2	3	4	5	6
Placentanährboden	3,0	3,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Rinderalbumin	–	–	–	–	1,0	1,0
Puffergemisch	–	–	1,0	1,0	–	1,0
Treponemensuspension in Rinderalbumin	–	1,0	1,0	–	1,0	1,0
Treponemensuspension in Placentabouillon	1,0	–	–	1,0	–	–

e) Kontrollen

1. Die verwendete Treponemensuspension wurde vor der Verimpfung im Dunkelfeld auf Anzahl und Beweglichkeit der Treponemen geprüft.
2. Ein Teil der Suspension wurde einem gesunden Kaninchen intratestal verimpft (0,5 ccm pro Hodenpol).
3. Zum Vergleich der Überlebensquote der Tr. p. wurde die jeweilige prozentuale Beweglichkeit der gleichen Treponemenaufschwemmung im Nährmedium nach Portnoy, Harris und Olansky (T. P. I.-Test) herangezogen, die den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt worden war.

f) Bestimmung der Überlebensquote

Auszählung der Tr. p. und Bestimmung der prozentualen Beweglichkeit erfolgte in gleicher Weise wie beim T.P.I.-Test im Trocken-Dunkelfeld nach 18-stündiger Inkubation.

III. Ergebnisse

a) Im Placentanährboden ohne Zusatz von Rinderalbumin zeigten nach 18 Std. nur bis zu 25 % der Tr. p. eine schwache Beweglichkeit bei veränderter Morphologie. Auch durch Zusatz von Puffergemisch konnte das Ergebnis nicht verbessert werden. Die Tr. p. konnten demnach nicht in einem Nährmedium nur aus Placentagewebe und -bouillon überleben.

b) Wurde jedoch das Hodengewebe in Rinderalbumin ausgeschüttelt und diese Rinderalbumin-Treponenmensuspension dem Placentanährboden zugesetzt, fanden sich nach 18 Std. bis zu 52 % gut bewegliche Tr. p. Die Morphologie der Tr. p. war wechselnd, vom stark veränderten bis zu völlig unveränderten Tr. p.

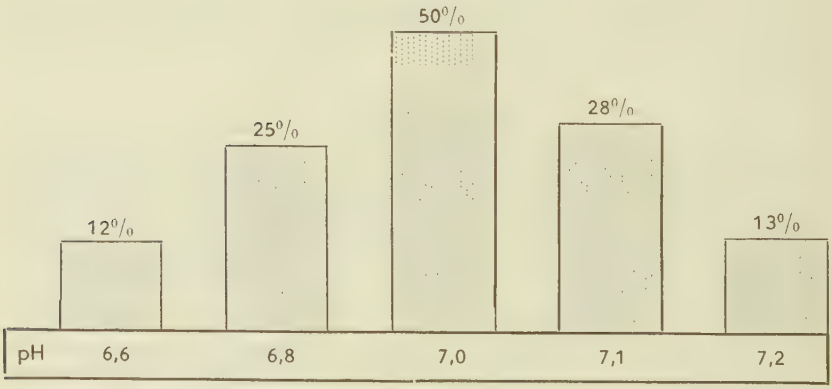
c) Da in dem für den T.P.I.-Test verwendeten Nährmedium 50 % Rinderalbumin enthalten sind, wurde der Anteil des Rinderalbumins im Placentanährboden ebenfalls auf 50 % erhöht. Es zeigte sich, daß die Erhöhung des Nährbodenanteils an Rinderalbumin ohne wesentlichen Einfluß auf die Erhaltung der Beweglichkeit der Tr. p. war.

Tabelle 4

		nach 18 Std. bewegl. Tr. p. in %	Intensität der Beweglichkeit	Morphologische Veränderungen der Tr. p.
Röhrchenbeschickung (nach Tabelle 3)	1	16 – 20	(+)	+
	2	20 – 25	(+)	+
	3	15 – 50	(+)	+
	4	30 – 52	++	(+)
	5	12 – 28	+	(+)
	6	48 – 52	++	(+)
Kontrolle im T. P. I.-Test-Medium		72 – 88	+++	∅

d) Nach 18 Std. trat in den Kulturen ohne Zusatz des Puffergemisches ein Abfallen des pH-Wertes bis 6,6 ein. Auch mit dem zusätzlichen Puffergemisch wurde nicht in jedem Fall ein Konstantbleiben des pH-Wertes erreicht. Es zeigte sich eindeutig eine Abhängigkeit der Zahl der nach 18 Std. beweglichen Tr. p. von der Höhe des pH-Wertes (Abbildung 1).

Abbildung 1



Mittelwerte der prozentualen Beweglichkeit der Tr. p. im Nährboden bei unterschiedlichem pH-Wert nach 18stündiger Inkubation.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unter Berücksichtigung der bisherigen Veröffentlichungen die Züchtungsverfahren beschrieben, mit denen angeblich Reinkulturen von virulenten Treponemata pallida gewonnen werden konnten. Nach heutigen Erkenntnissen handelte es sich bei diesen Kulturen jedoch entweder um solche von saprophytischen Spirochäten oder um avirulente Kulturstämme des Tr. p.

Eagle, Steinman und Oyama gelang es, ein chemisch genau definiertes Nährmedium für Reiter-Spirochäten herzustellen, so daß die Stoffwechselvorgänge in einem kontrollierbaren Medium studiert werden konnten. Die gelungene Massenkultivierung von Reiter-Spirochäten bot die Möglichkeit einer chemischen Fraktionierung und Untersuchung der Kulturspirochäten.

In einem von Nelson entwickelten Nährmedium konnten virulente Tr. p. bis zu 192 Std. überleben. Sie zeigten ein Längenwachstum, aber keine Vermehrung. Dieses Nährmedium gelangte durch seine Verwendung beim T.P.I.-Test zur praktischen Bedeutung. Die Tr. p. konnten bis heute nur in Form einer Mischkultur, nicht aber in Reinkultur in einem künstlichen Nährmedium gezüchtet werden.

Durch eine Gegenüberstellung der für virulente Tr. p. und für avirulente Kulturstämme gefundenen Wachstumsfaktoren wurden die Verschiedenheiten der nutritiven Erfordernisse gezeigt. Die bei der Züchtung der Kulturstämme gewonnenen Erkenntnisse über den Stoffwechsel ließen sich nur zum Teil auf die virulenten Tr. p. übertragen.

Alle Versuche, den virulenten Nichols-Stamm auf der Chorionallantoismembran im lebenden Hühnerei zu kultivieren, brachten kein eindeutiges Ergebnis. Es gelang durch Inokulation von mit virulenten Tr. p. (Nichols) infizierten Hühnerembryonen auf Kaninchen zwar syphilitische Orchitiden zu erzeugen, der Beweis einer Vermehrung von Tr. p. im Hühnerei konnte jedoch nicht erbracht werden.

Unter anaeoben Bedingungen konnten Newcomer und Haanes den avirulenten Nichols-Stamm und Beardmore und Dodd den Reiter-Stamm im befruchteten Hühnerei fortpflanzen. Mit gleicher Methode den virulenten Nichols-Stamm zu züchten, wurde bisher noch nicht versucht.

Züchtungsversuche in Gewebenährböden ergaben nur ein Überleben der virulenten Tr. p. für einige Tage, jedoch kein Wachstum.

Die gebräuchlichsten Züchtungsverfahren für Anaerobier wurden erwähnt und die Theorien der Atmungsvorgänge, sowie der günstige Effekt besprochen, den Stoffwechselorgane als Nährbodenzusatz auf das Wachstum der Anaerobier haben.

Eigene Versuche mit einem Placenta-Nährboden ergaben:

a) In einem Nährmedium aus Placentagewebe und -bouillon konnte nach 18-stündiger anaerober Bebrütung bei 35° C nur eine Beweglichkeit bis zu 25 % der Tr. p. (virulenter Nichols-Stamm) nachgewiesen werden.

b) Nach Zusatz von Rinderalbumin bis zu 50 % der Gesamtmenge des Nährbodens wurde nach 18 Std. eine Beweglichkeit von 52 % der Tr. p. beobachtet.

c) Es konnte demnach weder der Placenta-Nährboden, noch ein aus Rinderalbumin und Placenta-Nährboden kombiniertes Nährmedium das für den T.P.I.-Test verwendete Nährmedium ersetzen.

Am Schluß der vorliegenden Arbeit möchte ich nicht versäumen, Herrn Professor Dr. Schuermann meinen besonderen Dank für die Überlassung des Themas auszusprechen.

Außerdem danke ich Herrn Direktor Dr. Laun für sein freundliches Entgegenkommen bei der Benutzung der Laboratoriumseinrichtungen der Staatlichen Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Würzburg, wie ich auch Herrn Dr. Rudolf Doepfmer und Herrn Dr. Klaus Gregorczyk für ihre wertvollen Anregungen zu meiner Arbeit zu danken habe.

Literatur

Aristovski, V. und I. Minkin: Anwendung von Natriumhydrosulfit ($Na_2H_2SO_4$) in Versuchen von Anaerobierzüchtung, speziell zur Züchtung der Spirochaeta pallida.
Sovet. Vrac. Gaz. **1**, 25 (1934) (Russisch)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. **48**, 57 (1934)

Aristowsky, W. und R. Hoeltzer: Zur Frage der Kultivierung der Spirochaeta pallida in flüssigen Nährböden.
Klin. Wschr. **1925**, 2016

Arnheim, G.: Kulturversuche der Spirochaeta pallida.
Dermat. Zbl. **12**, 290 (1909)

Vereinfachte Kulturmethode der Spirochaeta pallida aus menschlichem Material.
Dtsch. med. Wschr. **1912**, 934

Spirochätenuntersuchungen.
Z. Hyg. **76**, 407 (1914)

Baeslack, F. W.: On the cultivation of the Treponema pallidum (Spirochaeta pallida).
J. Infekt. Dis. **12**, 55 (1913)
Zit. nach Kast and Kolmer, Amer. J. Syph. **13**, 419 (1929)

Beardmore, W. B. and M. C. Dodd: The growth of the Reiter strain of Treponema pallidum in the chick embryo.
J. Bact. **60**, 5 (1950)

Bessemans, A. et E. de Meirsman: Tentativis de culture de Treponema pallidum sur la membrane chorio-allantoidienne de l'embryon de poulet vivant.
C. r. Soc. Biol. Paris **127**, 847 (1938)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. **60**, 63 (1938)

Binder, E.: Ueber den Einfluß niedriger Temperaturen (insbesondere bei Eisschrankaufbewahrung von Transfusionsblut) auf die Syphilisspirochäte.
Aerztl. Wschr. **6**, 901 (1951)

Boak, R. A., C. M. Carpenter and S. L. Warren: Studies on the physiological effects of fever temperatures. III. The thermal death time of Treponema pallidum in vitro.
J. Eper. Med. **56**, 741 (1932)

Boak, R. A., M. L. Fawcett and C. M. Carpenter: Studies on the cultivation of Treponema pallidum.
Amer. J. Syph. **33**, 409 (1949)

Brewer, J. H.: Clear liquid mediums for the „aerobic" cultivation of anaerobes.
J. Amer. Med. Assoc. **115**, 598 (1940)

Bronfenbrenner, J.: Zit. nach Kast and Kolmer.
Amer. J. Syph. **13**, 419 (1929)

Callaway, J. L. and J. Sharp: Cultivation of Spirochaeta pallida on the chorioallantois membrane of the developing hen egg.
J. Lab. a. Clin. Med. **27**, 232 (1941)

Davis, B. D. and R. J. Dubos: The binding of fatty acids by serum albumin, a protective growth factor in bacteriological media.
J. Eper. Med. **86**, 215 (1947)

Delacrétaz, J.: Etude d'un nouveau milieu de survie pour les Tréponèmes pales, utilisable pour le test d'immobilisation (Réaction de Nelson).
Ann. Dermat. et Syph. **80**, 501 (1953)

Eagle, H. and H. G. Steinman: The nutritional requirements of treponemata. I. Argine, acetic acid, sulfur-containing compounds, and serum albumin as essential growth-promoting factors for the Reiter treponeme.
J. Bact. **56**, 163 (1948)

Frei, W. und L. Riedmüller: Die Verwendung des Zysteins bei der Anaerobenzüchtung.
Zbl. Bakt. I. Orig. **119**, 282 (1930/31)

Reduktionspotential und Anaerobenzüchtung.
Zbl. Bakt. I. Orig. **121**, 97 (1931)

Frieboes, W. und W. Zündel: Erfahrungen mit der Pallidareaktion.
Arch. Dermat. u. Syph. 175, 255 (1937)

Führer, F.: Ueber den heutigen Stand der Luesserodiagnostik.
Aerztl. Wschr. 7, 644 (1952)

Gaethgens, W.: Zusammenfassende Arbeit über die bisherigen Erfahrungen mit der Pallida-Reaktion.
Arch. Dermat. u. Syph. 176, 42 (1937)

Gammel, J.A. and E.E. Ecker: The virulence of Spirochaeta pallida in culture.
Arch. of Dermat. 23, 439 (1931)

Gelperin, A.: Morphology, cultural characteristics and a method for mass cultivation of the Reiter spirochete.
Amer. J. Syph. 33, 101 (1948)

Grigorieff, P.: Die experimentelle Syphilis in den wissenschaftlichen sowjetischen Arbeiten seit 1917 bis 1937.
Vestn. Venerol. i Dermat. 11, 1063 (1937) (Russisch).
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 60, 272 (1938)

Ueber Pathogenität von Reinkulturen der Spirochaeta pallida.
Vestn. Venerol. i Dermat. 1, 82 (1939) (Russisch).
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 63, 73 (1940)

Grütz, O.: Beiträge zur Reinkultur der Spirochaeta pallida.
Arch. Dermat. u. Syph. 147, 337 (1924)

Haanes, M., R.H. Wiggall and E.D. Delamater: Observations on the growth of the nonpathogenic Kazan strain of Treponema pallidum in embryonated hens'eggs of various ages.
Amer. J. Syph. 34, 214 (1950)

Hard, S.: Attempts to cultivate virulent Treponema pallidum in embryonated hen and goose eggs.
Acta Dermato-Venerol. 32, 373 (1952)

Investigations into the possibility of cultivating Treponema pallidum in culture media containig phytogenic growth factors.
Acta Dermato-Venerol. 32, 381 (1952)

Höltzer, R.R.: Zur Methode der Kultivierung der Sp. pallida.
Z. Immun. forsch. 72, 320 (1931)

Hoffmann, E. und W. Frohn: Ueber Gewinnung einer direkten virulenten Reinkultur der Spirochaeta pallida aus Kaninchensyphilom in flüssigem Nährboden.
Klin Wschr. 1934, 206

Hoffmann, W.H.: Beiträge zur Reinzüchtung der Spirochaete pallida.
Z. Hyg. 68, 27 (1911)

Die Uebertragung der Syphilis auf Kaninchen mittels reingezüchteter Spirochäten vom Menschen.
Dtsch. med. Wschr. 1911, 1546

Die Reinzüchtung der Spirochaete pallida.
Berl. klin. Wschr. 1911, 2160

Hoshina, K.: Die Wirkung von alipathischen Alkoholen auf die Reinkulturen von Spirochaeta pallida (Kroo).
Lues (Kyoto) 11, Nr. 2 u. dtsch. Zus.-fass. 8—10 (1934) (Japanisch)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 51, 138 (1935)

Die Wirkung des Pyridins und seiner Alkylderivate auf die Reinkulturen von Spirochaeta pallida (Kroo).
Lues (Kyoto) 11, 176 u. dtsch. Zus.-fass. 16—18 (1934) (Japanisch)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 51, 60 (1935)

Jahnel, E.: Läßt sich die Spirochaeta pallida auf künstlichem Nährboden kultivieren?
Klin.Wschr. 1934, 550

Kast, C.C. and J.A. Kolmer: Concerning the cultivation of Spirocheta pallida.
Amer. J. Syph. 13, 419 (1929)

On the cultivation of Spirocheta pallida in living tissue media.
Amer. J. Syph. 17, 529 (1933)

One succesful cultivation of Spirocheta pallida from syphilitic chancre of the rabbit.
Amer. J. Syph. 17, 533 (1933)

Kissmeyer, A.: Reinzüchtung der Spirochaeta pallida.
Hospitalstidende 1914, 1249
Ref. Arch. Dermat. u. Syph. 122, 448 (1918)

Ueber den Einfluß niederer Temperaturen auf Kulturen von Spirochaete pallida.
Münch. med. Wschr. 1923, 775

Koch, F.: Zur Biologie der Pallidakultur.
Arch. Dermat. u. Syph. 177, 216 (1937)

Vergleichende Untersuchungen an Kulturen von Spirochaete pallida und saprophytischen Genitalspirochäten (Jahnel).
Zbl. Bakt. I. Orig. 145, 338 (1940)

Krantz, W.: Spirochätenkulturen in salvarsanhaltigem Nährboden.
Münch. med. Wschr. 1922, 1782

Versuche, das Kulturverfahren für das experimentelle Studium der Neosalvarsanwirkung auf die Syphilisspirochäten heranzuziehen.
Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 7, 450 (1923)

Die Kultivierung der Spirochaeta pallida in flüssigen Nährböden.
Klin. Wschr. 1923, 1698

Ueber Nährböden zur Kultivierung der Spirochaete pallida.
Klin. Wschr. 1924, 193

Ueber feste und flüssige Nährböden zur Kultivierung der Spirochaeta pallida.
Zbl. Bakt. I. Orig. 92, 216 (1924)

Kroo und Schulze: Zit. nach Kast and Kolmer, Amer. J. Syph. 13, 419 (1929)

Little, P.A. and Y. SubbaRow: Use of refined serum albumin as a nutrient for Treponema pallidum.
J. Immun. 50, 213 (1945)

Magnuson, H.J., H. Eagle and R. Fleischman: The minimal infectious inoculum of Spirochaeta pallida (Nichols strain), and a consideration of its rate of multiplication in vivo.
Amer J. Syph. 32, 1 (1948)

Manteufel, P.: Untersuchungen zu der Frage, ob die pathogenen Spirochäten sauerstoffbedürftige oder sauerstoffscheue Mikroorganismen sind.
Zbl. Bakt. I. Orig. 89, 266 (1923)

Mühlens, P.: Reinzüchtung einer Spirochäte (Spirochaeta pallida?)
Dtsch. med. Wschr. 1909, 1261

Nakano, H., Ueber die Reinzüchtung der Spirochaeta pallida.
Dtsch. med. Wschr. 1912, 1333

Nelson, R.A.: Factors affecting the survival of Treponema pallidum in vitro.
Amer. J. Hyg. 48, 120 (1948)

Nelson, R.A. and J.A. Diesenbruck: Studies on treponemal immobilizing antibodies in syphilis. I. Techniques of measurements and factors influencing immobilization.
J. Immun. 66, 667 (1951)

Nelson, R.A. and M.M. Mayer: Immobilization of Treponema pallidum in vitro by antibody produced in syphilitic infection.
J. Exper. Med. 89 369 (1948)

Newcomer, V.D. and M. Haanes: Observations on the growth of the nonpathogenic Nichols strain of Treponema pallidum in the embryonated chick egg under anaerobic conditions.
Amer. J. Syph. 33, 318 (1949)

Noguchi, H.: Ueber die Gewinnung der Reinkulturen von pathogener Spirochaete pallida und von Spirochaete pertenuis.
Münch. med. Wschr. **1911**, 1550

Kultivierung des pathogenen Treponema pallidum.
J. Amer. Med. Assoc. **1911**, 102
Ref. Arch. Dermat. u. Syph. **112**, 496 (1912)

Zur Züchtung der Spirochaeta pallida.
Berl. klin. Wschr. **1912**, 1554

Die Identifizierung der Spirochaeta pallida in der Kultur.
J. Amer. Med. Assoc. **1912**, 1236
Ref. Arch. Dermat. u. Syph. **115**, 877 (1913)

Organesjan, P.: Zur Frage der Züchtung von Reinkulturen der Spirochaeta pallida.
Trudy 3. vses. S-ezda Borba vener. Bol. **291** (1932) (Russisch)
Ref. Zbl. Haut- u. Geschl.-Krankh. **46**, 492 (1933)

Oyama, V.I., H.G. Steinman and H. Eagle: The nutritional requirements of treponemata. V. A detoxified lipide as the essential growth factor supplied by crystallized serum albumin.
J. Bact. **65**, 609 (1953)

Perry, W.L.M.: The cultivation of Treponema pallidum in tissue culture.
J. Path. Bakt. **60**, 339 (1948)

Portnoy, J., Harris and S. Olansky: Studies of the Treponema pallidum immobilization (TPI) test.
Amer. J. Syph. **37**, 101 (1953)

Reiter, H.: Ueber die Fortzüchtung von Reinkulturen der Sp. pallida, Sp. dentium und Sp. recurrens.
Klin. Wschr. **1926**, 444

Spirochätenkulturen und ihre Anwendung.
Derm. Wschr. **1929**, 1401

Rice, F.A.H. and R.A. Nelson: The isolation from beef serum of a survival factor for Treponema palidum.
J. Biol. Chem. **191**, 35 (1951)

Rosahn, P.D.: The infectivity of Treponema pallidum in excised syphilitic tissue.
Amer. J. Hyg. **22**, 283 (1935)

Rose, N.R. and H.E. Morton: The cultivation of treponemes with the preservation of characteristic morphology.
Amer. J. Syph. **36**, 1 (1952)

Rowe, R.J. and A.C. Curtis: Studies of the life and motility of Treponema pallidum in fertile hens'eggs.
Amer. J. Syph. **33**, 303 (1949)

Saurino, V.R.: A modification of the Nelson treponemal sustaining medium for use in the Treponema pallidum immobilization test.
Amer. J. Syph. **37**, 112 (1953)

Schereschewsky, J.: Züchtung der Spirochaeta pallida (Schaudinn).
Dtsch. med. Wschr. **1909**, 835

Weitere Mitteilung über die Züchtung der Spirochaeta pallida.
Dtsch. med. Wschr. **1909**, 1260

Bisherige Erfahrungen mit der gezüchteten Spirochaeta pallida.
Dtsch. med. Wschr. **1909**, 1652

Erkennung des Syphiliserregers auf dem Wege der Züchtung der Spirochaeta pallida.
Berl. klin. Wschr. **1910**, 1927

Die Uebertragung der Syphilis auf Kaninchen mittels reingezüchteter Spirochäten von Menschen.
Dtsch. med. Wschr. **1911**, 1798

Reinzüchtung der Syphilisspirochäten.
Dtsch. med. Wschr. **1912**, 1335

Vereinfachung des Verfahrens zur Reinzüchtung der Syphilisspirochäten.
Dtsch. med. Wschr. 1913, 1408

Primäraffekt und Keratitis parenchymatosa beim Kaninchen, bewirkt durch Reinkulturen von Syphilisspirochäten.
Dtsch. med. Wschr. 1914, 1835

Seba, J.: The haemocultivation of Treponema pallidum.
Ceská Dermat. 27, 215, mit engl. Zus.-fass. (1952) (Tschechisch)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 84, 252 (1953)

Shmamine, T.: Eine einfache Schnellfärbungsmethode von Spirochäten.
Zbl. Bakt. I. Orig. 61, 410 (1911)

Ueber die Reinzüchtung der Spirochaeta pallida und der nadelförmigen Bakterien aus syphilitischem Material, mit besonderer Berücksichtigung der Reinkultur von Spirochaeta dentium und des Bac. fusiformis aus der Mundhöhle.
Zbl. Bakt. I. Orig. 65, 311 (1912)

Sowade, H.: Syphilitische Allgemeinerkrankung beim Kaninchen durch intrakardiale Kulturimpfung.
Dtsch. med. Wschr. 1911, 682

Ueber Spirochaeta pallida-Kulturimpfungen nebst Bemerkungen über die Wa. R. beim Kaninchen.
Dtsch. med. Wschr. 1911, 1934

Eine Methode zur Reinzüchtung der Syphilisspirochaete.
Dtsch. med. Wschr. 1912, 797

Steinman, H. G. and H. Eagle: Nutritional requirements of treponemata. II. Pantothenic acid, glutamine, and phenylalanine as additional growth-promoting factors for the Reiter treponeme.
J. Bact. 60, 57 (1950)

Steinman, H. G., H. Eagle and V. I. Oyama: The nutritional requirements of treponemata. III. A defined medium for cultivation of the Reiter treponeme.
J. Bact. 64, 265 (1952)

Sterzi, G. e V. Staudacher: Tentativi di coltura della spirocheta di Schaudinn sulla membrana corionallantoidea di embryone di pollo vivente.
Giorn. ital. Dermat. 80, 777 (1939)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 64, 148 (1940)

Supniewski, J. T. und J. Hano: Veränderung chemischer Verbindungen unter dem Einfluß der Spirochaeta pallida.
Med. doswiadez. spol. 17, 338 (1933) (Polnisch)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 48, 474 (1934)

Szeczi, S.: Zit. nach Kast and Kolmer, Amer. J. Syph. 13, 419 (1929)

Tilden, E. B.: Filtration of Treponema pallidum and Treponema novyi through colloidon membranes.
J. Bact. 33, 307 (1937)

Tomasczewski: Ein Beitrag zur Reinzüchtung der Spirochaeta pallida.
Berl. klin. Wschr. 1912, 1556

Turner, T. B. and N. L. Brayton: Factors influencing the survival of spirochetes in the frozen state.
J. Exper. Med. 70, 639 (1939)

Vásárhelyi, J.: Ein Verfahren zur Reinzüchtung der Spirochaeta pallida.
Zbl. Bakt. 124, 365 (1932)

Beiträge zur Biologie der Spirochaeta pallida.
Magy. orv. Arch. 36, 34 (1935) (Ungarisch)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 51, 228 (1935)

v. Wassermann, A. und M. Ficker: Reinkulturen der Spirochaete pallida in festem und flüssigem Nährboden, sowie Uebertragung dieser Kulturen auf Tiere.
Klin. Wschr. 1922, 1101

Weiss, C. and D. Wilkes-Weiss: Study of cultural requirements of Spirochaeta pallida.
J. Infect. Dis. 34, 212 (1924)
Ref. Zbl. Haut- und Geschl.-Krankh. 15, 220 (1925)

Whiteley, H. R. and C. N. Frazier: A study of the nutritional requirements of the Reiter strain of Treponema pallidum.
Amer. J. Syph. 32, 43 (1948)

Wile, U. J. and S. A. M. Johnson: Further study of the chick embryo as a culture medium for the Spirochaeta pallida.
Amer. J. Syph. 28, 187 (1944)

Wile, U. J. und P. H. de Kruif: Kulturversuche mit Spirochaeta pallida, von einem paralytischen Gehirn stammend.
paralytischen Gehirn stammend.
J. Amer. Med. Assoc. 1916, 646
Ref. Dermat. Wschr. 1916, 798

Wile, U. J. and J. S. Snow: The chick embryo as a culture medium for the Spirochaeta pallida.
J. Invest. Dermat. 4, 103 (1941)
Zit. nach Snow, Amer. J. Syph. 24, 780 (1940)

Worms, W.: Zit. nach W. Bruck, Zbl. Haut- u. Geschl.-Krankh. 2, 244 (1921)

Zinsser, H., J. G. Hopkins and R. Gilbert: Notes on the cultivation of Treponema pallidum.
J. Exper. Med. 21, 213 (1915)
Zit. nach Kast and Kolmer, Amer. J. Syph. 13, 419 (1929)

Zinsser, H., J. G. Hopkins and M. Mc Burney: Studies on Treponema pallidum and syphilis. VI. The difference in behavior in immune serum between cultivated nonvirulent Treponema pallidum and virulent treponemata from lesions.
J. Exper. Med. 23, 341 (1916)
Zit. nach Kast and Kolmer, Amer. J. Syph. 13, 419 (1929)

Lebenslauf

Am 16. 7. 1924 wurde ich, Gisela Freiin von Schleinitz, in Braunschweig als Tochter des damaligen Leutnants Wolf Dietrich Freiherr von Schleinitz und seiner Ehefrau Hildegard, geb. von Roques, geboren. Nach Besuch der Volksschulen in Celle, Münster i. W. und Berlin (1930—1934) und der Höheren Lehranstalten für Mädchen in Berlin, Neuruppin und Würzburg (1934—1942) bestand ich am 1. 4. 1942 das Abitur an der Mozartschule in Würzburg. Bis zum Beginn des Medizinstudiums im Sommer-Semester 1943 an der Universität Würzburg leistete ich die vorgeschriebene einjährige Dienstzeit im Reichsarbeitsdienst und Kriegshilfsdienst ab. Im Sommer 1944 bestand ich das Vorphysikum in Würzburg, mußte danach jedoch auf Grund des Gesetzes für den totalen Kriegseinsatz das Studium unterbrechen. Ich nahm an einem Ausbildungskurs für med.-techn. Gehilfinnen teil und arbeitete als solche vom Frühjahr 1945 bis zur Wiedereröffnung der Universität Würzburg im Winter-Semester 1945/46 im Labor der Staatl. Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Würzburg. Nach dem Winter-Semester 1945/46 mußte ich wegen finanzieller Notlage im Elternhaus das Studium abermals aufgeben, arbeitete bis 1949 kaufmännisch in der Uhren- und Schmuckwarenbranche und anschließend bis zur endgültigen Wiederaufnahme des Studiums im Winter-Semester 1951/52 als med.-techn. Gehilfin im klinischen Labor der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg und in der Staatl. Bakteriologischen Untersuchungsanstalt Würzburg. Im Februar 1952 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab und begann nach dem Sommer-Semester 1954 die ärztliche Prüfung, die ich am 8. 2. 1955 beendete.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Gisela Freiin von Schleinitz.

Buchdruckerei Seis u. Sebald, Ellingen